



Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

**Estudio del sistema regulador formado por la  
serotonina y sus receptores en las células  
troncales MSC aisladas de médula ósea  
humana. Adipogénesis.**

Laura González Méndez

Madrid, 2014



Departamento de Biología Molecular  
Facultad de Ciencias  
Universidad Autónoma de Madrid

**Estudio del sistema regulador formado por la  
serotonina y sus receptores en las células  
troncales MSC aisladas de médula ósea  
humana. Adipogénesis.**

Laura González Méndez  
Licenciada en Ciencias Biológicas

Director de Tesis: Profesora Dra. Josefa Predestinación García Ruiz  
Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias  
CSIC-UAM





Este trabajo ha sido financiado por:

Proyecto del Fondo de Investigaciones Sanitarias del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

JOSEFA PREDESTINACIÓN GARCÍA RUIZ, Profesora de Bioquímica y Biología Molecular del Dpto. de Biología Molecular de la facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, Campus Universitario de Cantoblanco 28049 Madrid, España.

Certifico que:

LAURA GONZÁLEZ MÉNDEZ, licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Madrid ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado:

**“Estudio del sistema regulador formado por la serotonina y sus receptores en las células troncales MSC aisladas de médula ósea humana. Adipogenesis”**

Considero, además, que el mencionado trabajo reúne la originalidad y calidad científica requeridas para poder ser presentado para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste a todos los efectos, firmo el presente certificado,

En Madrid, 03 de febrero de 2014.

Fdo: Josefa Predestinación García Ruiz

Francisco Tomás y  
Valiente, 7.  
28049 Madrid, España  
Tel: 34 91 497 43 31



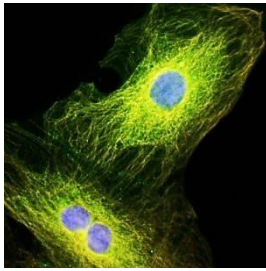
## ***A mis padres***

La frase mas excitante que se puede oir en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es "¡Eureka!" (¡Lo encontré!) sino "Es extraño ..."

Isaac Asimov.





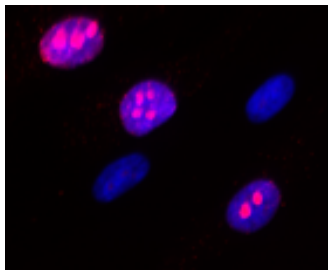


## *Resumen*



En los últimos años se ha identificado a la serotonina como un regulador crítico de la masa ósea, regulando tanto directa como indirectamente la actividad de las células responsables del proceso de remodelación ósea, osteoclastos y osteoblastos. El presente trabajo muestra que las MSCs aisladas de la médula ósea humana, células precursoras de osteoblastos, adipocitos y condroblastos, expresan un sistema para sintetizar (Tph-1), transportar (5-HTT) y responder (receptores de 5-HT) a serotonina, e indica que la serotonina estimula la diferenciación adipocítica de estas células. El análisis de los posibles mecanismos moleculares implicados en la señalización serotoninérgica en las hMSCs indica una activación de  $5\text{-HT}_2 \rightarrow \text{NADP(H)oxidasas} \rightarrow \text{ERK1/2} \rightarrow \text{c-Fos}$ , así como una activación de los factores FoxO. La señalización ROS/FoxO en las células de la médula ósea cumple un papel fundamental en el desarrollo de osteoporosis durante el envejecimiento y tras la menopausia. Los análisis realizados muestran que la respuesta de las hMSCs a serotonina es dependiente de la concentración de estrógenos: altas concentraciones de estradiol regulan negativamente el efecto proadipogénico de la serotonina en los cultivos de hMSCs y existe una acción sinérgica de ambas hormonas para estimular la proliferación de estas células. Nuestros resultados encajan con el nuevo papel descrito para la serotonina como regulador clave de los metabolismos óseo y energético a través de sus acciones, tanto centrales como periféricas, sobre el tejido adiposo productor de leptina y las células de la médula ósea responsables de la formación/resorción de la masa ósea (remodelación ósea) y la liberación de osteocalcina.





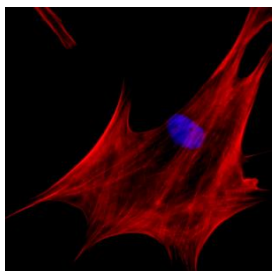
## *Abstract*



In recent years serotonin has been identified as a critical regulator of bone mass, both directly and indirectly regulating the activity of the cells responsible for bone remodeling process, osteoclasts and osteoblasts. The present work shows that MSCs isolated from human bone marrow, precursors cells for osteoblast, adipocytes and chondroblasts, express a system to serotonin synthesis (Tph-1), transport (5-HTT) and signaling (5-HT receptors), and indicates that serotonin stimulates adipocyte differentiation of hMSCs. The analysis of the potential molecular mechanisms underlying serotonergic signaling in hMSCs indicates an activation of 5-HT<sub>2</sub> → NADP(H)oxidase → ERK1/2 → c-Fos and FoxO factors. ROS / FoxO signaling in bone marrow cells plays a critical role in the development of osteoporosis in aging and after menopause. Our findings show that the response of hMSCs to serotonin is dependent upon the estrogens concentration: high estradiol concentrations downregulates the adipogenic effect of serotonin in cultured hMSCs and exists a synergistic action of both hormones to stimulate proliferation of these cells. Our results match the new role for serotonin as a key regulator of bone and energy metabolism through its actions, both central and peripheral, on adipose tissue and bone marrow cells responsible for the formation/resorption in bone mass (bone remodeling) and osteocalcin release.







## *Índice*

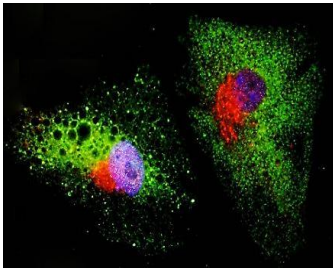


<b>Resumen</b>	<b>I</b>
<b>Abstract</b>	<b>V</b>
<b>Índice</b>	<b>3</b>
<b>Clave de Abreviaturas</b>	<b>9</b>
<b>Introducción</b>	<b>15</b>
<b>1. Células madre mesenquimales (MSCs)</b>	<b>15</b>
1.1. Variabilidad fenotípica de los cultivos de MSCs en función de su origen	15
1.2. MSCs y reparación de tejidos	16
<b>2. Metabolismos óseo y energético</b>	<b>18</b>
2.1. Adipocitos de la médula ósea	19
<b>3. Adipogénesis vs. Osteoblastogénesis en MSCs. Mecanismos Reguladores</b>	<b>21</b>
3.1. Señalización Wnt/ $\beta$ -catenina	23
3.2. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y factores FoxO ( <i>forkhead boxO</i> )	24
3.3. Estrógenos	27
3.3.1. Síntesis y acción de estrógenos en la médula ósea	27
3.4. Glucocorticoides	28
<b>4. Serotonina</b>	<b>29</b>
4.1. Señalización serotoninérgica	30
4.2. Papel de la serotonina en la fisiología del esqueleto	32
4.2.1. Regulación de la masa ósea por la serotonina periférica (intestino)	33
4.2.2. Regulación de la masa ósea por la serotonina central (SNC)	33
4.2.3. Regulación de la masa ósea por leptina: control de la síntesis de serotonina en el SNC	34
<b>Objetivos</b>	<b>37</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>41</b>
1. Cultivo de hMSCs	41
2. Ensayos de diferenciación	41
3. Ensayos de proliferación y viabilidad celular	42
4. Cuantificación de la adhesión celular a sustrato de fibronectina	42

5. Ensayo de migración celular por herida	43
6. RT-PCR	43
7. Inmunocitoquímica	45
8. Obtención de extractos proteicos	47
9. Análisis de proteínas mediante <i>Western blot</i>	47
10. Detección de ROS mediante marcaje con DFCDA	48
11. Identificación y cuantificación de adipocitos	49
11.1. Marcaje con Bodipy 488	49
11.2. Marcaje con <i>Oil Red O</i> (ORO)	49
12. Identificación y cuantificación de osteoblastos	50
12.1. Tinción de fosfatasa alcalina	50
12.2. Cuantificación de la actividad fosfatasa alcalina mediante <i>pNPP</i>	50
13. Análisis estadístico	50
<b>Resultados</b>	<b>53</b>
<b>1. Respuesta a serotonina en MSCs obtenidas de médula ósea humana</b>	<b>53</b>
1.1. Determinación de la expresión de genes y proteínas del sistema serotoninérgico en hMSCs	53
1.2. La 5-HT no altera la proliferación en los cultivos de hMSCs	54
1.3. Análisis del citoesqueleto de hMSCs cultivadas en presencia de 5-HT	56
1.4. Acción sinérgica de 5-HT y E2 en la proliferación de hMSCs	58
1.5. Las hMSCs expresan un sistema para sintetizar y responder a estrógenos	59
1.6. La 5-HT estimula la adhesión de hMSCs	61
1.7. La 5-HT activa la MAPK ERK1/2 en hMSCs a través de sus receptores 5-HT2A y 5-HT2B	63
1.8. El E2 activa ERK1/2 en hMSCs. Relación con el estímulo serotoninérgico	65
1.9. La 5-HT induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de factores FoxO en las hMSCs	66
1.10. La activación de ERK1/2 en respuesta a serotonina es dependiente del estatus oxidativo celular y de la actividad NADP(H) oxidasa en hMSCs	68
1.11. La 5-HT induce la translocación nuclear de c-Fos en hMSCs mediante la activación de 5-HT2A, NAD(P)H oxidasa y ERK1/2	70
1.12. La migración de hMSCs es dependiente de las actividades de NADP(H) oxidasa y ERK1/2	73
1.13. Receptor de glucocorticoides (GR) y c-Fos en respuesta a 5-HT	75

<b>2. La serotonina estimula la adipogénesis en hMSCs</b>	<b>78</b>
2.1. Caracterización de la diferenciación adipocítica de hMSCs	78
2.1.1. Las hMSCs mantienen la expresión del sistema para sintetizar y responder a 5-HT durante su programa adipogénico	81
2.1.2. Los estrógenos durante el programa adipogénico de las hMSCs	83
2.2. Regulación de la adipogénesis por 5-HT en hMSCs	85
2.2.1. La 5-HT estimula la acumulación de vesículas lipídicas durante la adipogénesis de hMSCs	85
2.2.2. La 5-HT estimula la expresión de genes del linaje adipogénico durante la diferenciación adipocítica de hMSCs	86
2.2.3. El estímulo proadipogénico de la serotonina es mediado por la activación del receptor 5-HT <sub>2A</sub> y negativamente regulado por la actividad 5-HT <sub>2B</sub>	87
2.2.4. Interdependencia entre las acciones proadipogénicas de 5-HT y E2	88
2.3. La 5-HT incrementa la viabilidad celular en los cultivos adipogénicos de hMSCs inducidos a largo plazo	89
2.4. La 5-HT induce la generación de ROS durante la adipogénesis de hMSCs	91
2.5. Regulación de factores FOXO y $\beta$ -catenina por 5-HT durante la adipogénesis de hMSCs	92
2.6. La 5-HT modula GR y c-FOS en hMSCs bajo inducción adipogénica	95
2.7. Proteínas STATs durante la adipogénesis de hMSCs	96
<b>3. La síntesis de serotonina en hMSCs regula negativamente su diferenciación osteoblástica</b>	<b>98</b>
<b>Discusión</b>	<b>103</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>113</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>117</b>





## *Clave de Abreviaturas*





**2D:** dos dimensiones

**5-HIAA:** ácido 5-hidroxiindolacético (*5-hydroxyindoleacetic acid*)

**5-HT:** 5-hidroxitriptamina (*5-hydroxytryptamine*)

**5-HTP:** 5-hidroxitriptófano (*5-hydroxytryptophan*)

**5-HTT:** transportador de 5-hidroxitriptamina (*5-hydroxytryptamine transporter*)

**AC:** adenilato ciclasa (*adenylate cyclase*)

**ADN:** ácido desoxiribonucleico

**Adr $\beta$ 2:** receptor adrenérgico  $\beta$ -2 ( *$\beta$ -2 adrenergic receptor*)

**AF:** función de activación (*activation function*)

**AIM:** medio de inducción adipogénica (*adipogenic induction medium*)

**AMPc:** adenosine monofosfato cíclico

**AP-1:** proteína activadora 1 (*activator protein 1*)

**aP2:** proteína de unión a lípidos del adipocito (*adipocyte lipid-binding protein*)

**APC:** (*adenomatous polyposis coli*)

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**BMP-2:** proteína morfogenética de hueso 2 (*bone morphogenetic protein 2*)

**BSA:** albúmina de suero bovino (*bovine serum albumine*)

**Cbfa1:** factor de unión core  $\alpha$ 1 (*core-binding factor alpha 1*)

**C/EBP:** proteína de unión al enhancer CCAAT (*CCAAT enhancer binding protein*)

**CFU-f:** unidad fibroblastoide formadora de colonias (*colony-forming unit fibroblast*)

**CYP19:** familia 19 del citocromo P450 (*cytochrome P450, family 19*)

**DAG:** diacil-glicerol

**DCF:** 2',7'-diclorofluoresceína (*2',7'-dichlorofluorescin*)

**DCFDA:** 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (*2',7'-dichlorofluorescein diacetate*)

**Dex:** dexametasona

**DMEM:** medio Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's modified Eagle's medium*)

**DPI:** (*diphenyleneiodonium*)

**E2:** 17- $\beta$  estradiol

**EGF:** factor de crecimiento endotelial (*endothelial growth factor*)

**EGFR:** receptor del factor de crecimiento endotelial (*endothelial growth factor receptor*)

**ER:** receptor de estrógenos (*estrogen receptor*)

**ERE:** elemento de respuesta a estrógenos (*estrogen responsive element*)

**ERK:** quinasa regulada por señales extracelulares (*extracellular regulated kinase*)

**FACS:** separador celular activado por fluorescencia (*fluorescence activated cell sorting*)

**FBS:** suero fetal bovino (*fetal bovine serum*)

**FBJ:** Finkel, Biskis y Jinkins

**FOS:** oncogen del osteosarcoma de FBJ (*FBJ osteosarcoma oncogene*)

**FoxO:** *forkhead box O*)

**GDP:** guanosina 5'-difosfato

**GLUT-4:** transportador de glucose 4 (*glucose transporter 4*)

**GPCR:** receptor acoplado a proteínas G (*G protein-coupled receptor*)

**GPR30:** receptor acoplado a proteínas G 30 (*G protein-coupled receptor 30*)

**GR:** receptor de glucocorticoides (*glucocorticoid receptor*)

**GSK-3 $\beta$ :** glucógeno sintasa quinasa-3 $\beta$  (*glycogen synthase kinase-3 $\beta$* )

**GTP:** guanosina 5'-trifosfato

**HG:** alta glucosa (*high glucose*)

**HIF-1a:** factor inducible por hipoxia 1a (*hypoxia-inducible factor 1a*)

**hMSC:** célula madre mesenquimal humana (*human mesenchymal stem cell*)

**HRP:** peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*)

**HSC:** célula madre hematopoyética (*hematopoietic stem cell*)

**IBMX:** 3-isobutil-1-metilxantina

**IGF-1:** factor de crecimiento similar a la insulina 1 (*insulin-like growth factor 1*)

**IL-1, IL-6:** interleuquinas 1 y 6 (*interleukins 1 and 6*)

**IP3:** inositol 1,4,5-trifosfato (*inositol 1,4,5-trisphosphate*)

**ITS:** insulina, transferrina y selenio

**JAK:** quinasa Janus (*Janus kinase*)

**JNK:** quinasa de Jun amino-terminal (*Jun amino-terminal kinase*)

**KLF:** factor tipo Krüppel (*Krüppel-like factor*)

**LeF:** factor de unión al potenciados linfoides (*lymphoid enhancer-binding factor*)

**LG:** baja glucosa (*low glucose*)

**LPL:** lipoproteína lipasa (*lipoprotein lipase*)

**Lrp5:** proteína 5 relacionada con el receptor de las lipoproteínas de baja densidad (*low density lipoprotein receptor-related protein 5*)

**MAO:** oxidasa de monoamines (*monoamine oxidase*)

**MAPK:** quinasa activada por mitógenos (*mitogen-activated protein kinase*)

**MSC:** célula madre mesenquimal (*mesenchymal stem cell*)

**MTT:** bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

**NAC:** N-acetil cisteína

**NAD(P)H:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida

**NF- $\kappa$ B:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

**NLK:** quinasa similar a Nemo (*Nemo-like kinase*)

**Nox4:** NAD(P)H oxidasa 4

**OIM:** medio de inducción osteogénica (*osteogenic induction medium*)

**ORO:** (*Oil Red O*)

**PASMC:** célula de musculo liso de la arteria pulmonar (*pulmonary artery smooth muscle cell*)

**PBS:** tampón fosfato salino (*phosphate-buffered saline*)

**PCPA:** p-clorofenilalanina (*p-chlorophenylalanine*)

**PDGF:** factor de crecimiento derivado de las plaquetas (*platelets-derived growth factor*)

**PI3K:** fosfatidilinositol 3-quinasa (*phosphoinositide 3-kinase*)

**PLC:** fosfolipasa C (*phospholipase C*)

**pNPP:** p-nitrofenilfosfato (*p-nitrophenyl phosphate*)

**PPAR $\gamma$ 2:** receptor activado por proliferador de peroxisoma  $\gamma$ 2 (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 2*)

**RANK:** receptor activador de NF $\kappa$ B (Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B)

**RANKL:** ligando de RANK (*RANK ligand*)

**ROS:** especies reactivas de oxígeno (*oxygen reactive species*)

**RUNX-2:** factor de transcripción relacionado con Runt 2 (*Runt-related transcription factor 2*)

**sFRP1:** proteína secretada relacionada con Frizzled 1 (*secreted Frizzled-related protein 1*)

**SGA:** segunda generación de antipsicóticos

**SNC:** sistema nervioso central

**Sod-3:** superóxido dismutase 3 (*superoxide dismutase 3*)

**SREBP:** proteína de unión al elemento regulador de esteroides (*sterol regulatory element-binding protein*)

**SSAO:** oxidasa de aminas sensible a semicarbazida (*semicarbazide-sensitive amine oxidase*)

**SSRI:** inhibidor específico de la recaptación de serotonina (*selective serotonin reuptake inhibitor*)

**STAT:** transductor de señal y activador de la transcripción (signal transducer and activator of transcription)

**TAD:** dominio de activación de la transcripción (*transcription activation domain*)

**TBS:** tampón Tris salino (*Tris buffered-saline*)

**Tcf:** factor de células T (*T-cell factor*)

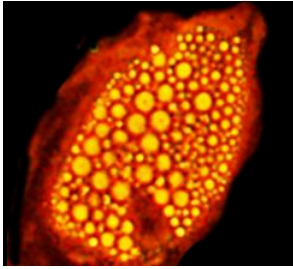
**TNF $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* )

**TPH:** triptófano hidroxilasa (*tryptophan hydroxylase*)

**VMH:** hipotálamo ventromedial (ventromedial hypothalamus)

**VSMC:** célula de músculo liso vascular (*vascular smooth muscle cell*)





## *Introducción*



## 1. Células madre mesenquimales (MSCs)

El interior de los huesos del esqueleto axial y apendicular (huesos largos, vértebras, costillas, esternón, huesos del cráneo, cintura escapular y pelvis) da protección a la médula ósea, tejido esponjoso que alberga células precursoras multipotentes esenciales para el organismo. Además de ser la principal fuente de células madre hematopoyéticas (HSCs, *hematopoietic stem cell*), cuyo papel es la renovación de las células sanguíneas, contiene células madre mesenquimales (MSCs, *Mesenchymal Stem Cells*), una población de células capaces de diferenciarse en múltiples linajes mesodérmicos como osteoblastos, adipocitos, condrocitos y fibroblastos (Pittenger et al., 1999), y aunque todavía motivo de controversia, en otros tipos celulares no mesodérmicos como células neuronales o hepatocitos (Chen et al., 2006; Snykers et al., 2009; Wislet-Gendebien et al., 2005).

En 2006 la *Internacional Society for Cell Therapy* propuso el siguiente criterio para la identificación mínima de MSCs humanas (Dominici et al., 2006): adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar, fenotipo celular por análisis FACS (CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup> o CD11b<sup>-</sup>, CD79a<sup>-</sup> o CD19<sup>-</sup>) y capacidad de diferenciación *in vitro* en osteoblastos, condrocitos y adipocitos. Sin embargo, algunos de estos criterios no han sido enteramente validados, ni entre especies ni dentro de una misma especie (Peister et al., 2004; Sung et al., 2008), y resultan demasiado dependientes de las condiciones de cultivo durante la expansión de las poblaciones de MSCs, por lo que resultan difícilmente extrapolables a las células nativas. La actual categorización de estas células es la de células madre mesenquimales (MSCs) como propuso A. Caplan (Caplan, 1991) debido a su capacidad de diferenciarse en células de linajes mesenquimales, o células estromales de la médula, debido a que pertenecen al estroma que soporta físicamente el nicho de las HSCs (Devine and Hoffman, 2000; Wilson and Trumpp, 2006). Esto ha llevado a proponer que el término “células estromales mesenquimales multipotentes” sea adoptado en lugar de “células madre mesenquimales” (Bianco et al., 2008; Horwitz et al., 2005). Sin embargo, el término más utilizado sigue siendo el de MSCs, por lo que en el presente trabajo nos referimos a ellas con este nombre.

### 1.1. Variabilidad fenotípica de los cultivos de MSCs en función de su origen

Las MSCs han sido aisladas de diferentes especies (Friedenstein et al., 1970) incluidos humanos (Bruno et al., 2009; Castro-Malaspina et al., 1980; Haynesworth et al., 1992; Yoo et al., 2009) y ratones (Gindraux et al., 2007; Sung et al., 2008), y de varios tejidos

además de la médula ósea, como sangre periférica (Zvaifler et al., 2000), sangre de cordón umbilical (Erices et al., 2000), gelatina de Wharton umbilical (Sarugaser et al., 2005), tejido adiposo (Zuk et al., 2002), fluido amniótico (In 't Anker et al., 2003), hueso compacto (Guo et al., 2006), periostio (De Bari et al., 2001a; De Bari et al., 2006; Nakahara et al., 1991), membrana sinovial (De Bari et al., 2001b; De Bari et al., 2003) y fluido sinovial (Jones et al., 2004), cartílago articular (Dowthwaite et al., 2004) y distintos tejidos fetales (Campagnoli et al., 2001; Miao et al., 2006). Las células derivadas de estos diferentes tejidos muestran una heterogeneidad fenotípica y diferentes capacidades de crecimiento, pero también muestran similitudes, como el potencial para diferenciarse en los linajes mesenquimales clásicos y la expresión de marcadores de superficie comunes (Baksh et al., 2007). Sin embargo, cada vez hay más evidencias de que existen importantes diferencias en la biología de las MSCs que son dependientes del tejido de origen, el cual parece ser la principal fuente de variación en las propiedades de estas células (De Bari et al., 2008). Como un ejemplo de estas diferencias, las MSCs de biopsias de tejido sinovial son más efectivas en reparar defectos en el cartílago de conejos que las MSCs de la médula ósea, músculo o grasa (Koga et al., 2008). Además, nuevamente debemos tener en cuenta la naturaleza dinámica de los cultivos de MSCs, que conlleva que MSCs aisladas y expandidas bajo condiciones de cultivo diferentes difieran dramáticamente en sus propiedades, y por tanto, probablemente también en sus potenciales terapéuticos. La resultante variabilidad de estos cultivos ha limitado la estandarización de estrategias de reparación ósea basadas en MSCs, por lo que existe una necesidad clínica de ensayos que garanticen el potencial de diferenciación de las preparaciones de MSCs (De Bari and Dell'accio, 2007).

### 1.2. MSCs y reparación de tejidos

La capacidad de las MSCs para expandirse en cultivo y diferenciarse en múltiples fenotipos celulares ha suscitado un gran interés sobre su potencial utilidad como agentes terapéuticos para la reparación de tejidos. La primera idea al respecto sugería una reparación por MSCs mediante injerto y diferenciación en el tejido dañado (Caplan, 1991; Prockop, 1997). Esta hipótesis inicial se apoyó en observaciones en animales de experimentación, en las que se describe como las MSCs anidan en los tejidos afectados y parecen diferenciarse y reemplazar las células apoptóticas o necróticas. Esto es particularmente evidente en crecimientos rápidos como neonatos, embriones, fetos y en animales adultos con tejidos muy dañados (Kopen et al., 1999; Munoz-Elias et al., 2004; Pereira et al., 1998; Pochampally et al., 2004; Sasaki et al., 2008; Wu et al., 2007).



Sin embargo, parece que en muchas situaciones las MSCs inducen reparación y mejora funcional de los tejidos dañados sin un significativo anidamiento y diferenciación en ellos (Iso et al., 2007; Ortiz et al., 2007; Tonel F., 2007). Esta acción es compatible con una reparación de tejidos por MSCs a través de secreciones paracrinas y/o contactos célula-célula. Esta posibilidad ya fue presagiada hace años al demostrarse la capacidad de los cultivos confluentes de MSCs para servir como capas nutricias para las HSCs (Eaves et al., 1991). Se ha demostrado que las MSCs en cultivo secretan un gran número de citoquinas y quimioquinas, entre otros factores (Caplan and Dennis, 2006; Prockop, 1997). Ahora tenemos evidencias de que aunque las MSCs pueden contribuir a la reparación de tejidos en algunas circunstancias mediante diferenciación, en distintos modelos animales y algunos pacientes se observan mejoras funcionales mediante una aparición transitoria de las células en el tejido dañado (Uccelli et al., 2008b) (Delgado MJ., tesis doctoral UAM 2010). En este punto es importante destacar que las MSCs deben responder al microambiente particular generado por el tejido dañado, secretando factores que parecen estar específicamente adaptados a las necesidades inmediatas del tejido. Esta respuesta de las MSCs a distintos microambientes está ampliamente ilustrada en la literatura sobre el papel de estas células como inhibidores de la respuesta inmune (Nauta and Fibbe, 2007; Uccelli et al., 2008a). Además, las MSCs residen en el nicho vascular de la mayoría de los tejidos adultos, donde aparecen asociadas a los vasos sanguíneos (Caplan and Correa; Crisan et al., 2008; Shi and Gronthos, 2003) (da Silva Meirelles et al., 2006). De hecho, se ha sugerido que los denominados pericitos podrían ser MSCs (Crisan et al., 2008). Las células endoteliales de los vasos y estas MSCs cuentan con un sistema de comunicación endocrina y paracrina que garantiza el suministro de oxígeno y nutrientes imprescindibles para la supervivencia celular durante la reparación del tejido (Grellier et al., 2009). Además, la formación de nuevas estructuras vasculares es un evento crucial tanto en el desarrollo y crecimiento del hueso como en la reparación tisular, y es un proceso estimulado por el conjunto de factores secretados por las MSCs. La posibilidad de que las MSCs residan en un nicho perivascular a lo largo del cuerpo aporta un escenario que favorece la capacidad de estas células para actuar sobre el tejido dañado, produciendo *in situ* los factores necesarios para inducir su reparación e impedir la activación del sistema inmune.

## **2. Metabolismos óseo y energético**

Lejos de ser la estructura estática que aparenta, el tejido óseo que constituye el esqueleto de los vertebrados es un tejido sumamente dinámico. De hecho, es el único tejido que contiene un tipo celular específico, el osteoclasto, cuya función fundamental es resorber (destruir) el tejido en el que reside. Esta resorción ósea forma parte de una función fisiológica vital del hueso en adultos conocida remodelación ósea. La unidad remodeladora del hueso encargada de este proceso en los huesos largos y vértebras está constituida por otros dos tipos celulares, los osteoblastos que secretan nueva matriz ósea y los osteocitos (osteoblastos diferenciados) mecanotransductores. La remodelación ósea es un perfecto ejemplo de función homeostática, en la que se alternan fases de resorción y formación de nuevo hueso gracias a una precisa coordinación entre las actividades de osteoblastos y osteoclastos mediada por los factores reguladores presentes en la matriz extracelular del nicho óseo (Harada and Rodan, 2003; Rodan and Martin, 2000; Teitelbaum, 2000).

Las tres funciones clásicas del hueso son la locomoción, la protección de órganos internos y la homeostasis de calcio y fósforo. La remodelación ósea asegura el mantenimiento de una excelente calidad ósea, garantizando las propiedades biomecánicas del esqueleto esenciales para la locomoción y la prevención y reparación de fracturas. Éste es un proceso que ocurre constante y simultáneamente en múltiples localizaciones a lo largo del cuerpo, lo que le convierte en una función fisiológica que requiere una gran cantidad de energía. Precisamente, la remodelación ósea y el metabolismo energético son dos procesos coordinados, lo que se aprecia en ciertos datos clínicos: la obesidad protege de la osteoporosis, un bajo índice de masa corporal incrementa la tasa de fracturas, los pacientes con hipogonadismo desarrollan osteoporosis. La leptina, citoquina secretada por los adipocitos en respuesta a la expansión de su almacén de triglicéridos, constituye la principal aferencia desde los depósitos periféricos de energía al SNC, donde regula distintas funciones como la capacidad reproductora, el apetito, el gasto energético y la masa ósea. Esta señal de leptina activa el sistema nervioso simpático en el hipotálamo, modulador eferente de los depósitos de energía, conduciendo así a un estímulo del gasto energético: se incrementa la captación y el metabolismo de glucosa en el músculo, la producción de glucosa en el hígado, la secreción de insulina en el páncreas, y la resorción en el hueso. Pero además de estas acciones centrales, la leptina periférica tiene efectos directos en el hueso, donde la respuesta a leptina consiste tanto en la inhibición de la actividad de osteoblastos como en la activación de la resorción osteoclástica a través de una mayor secreción de RANKL por los osteoblastos. De esta manera, el proceso de remodelación ósea es regulado en función del status energético del organismo.

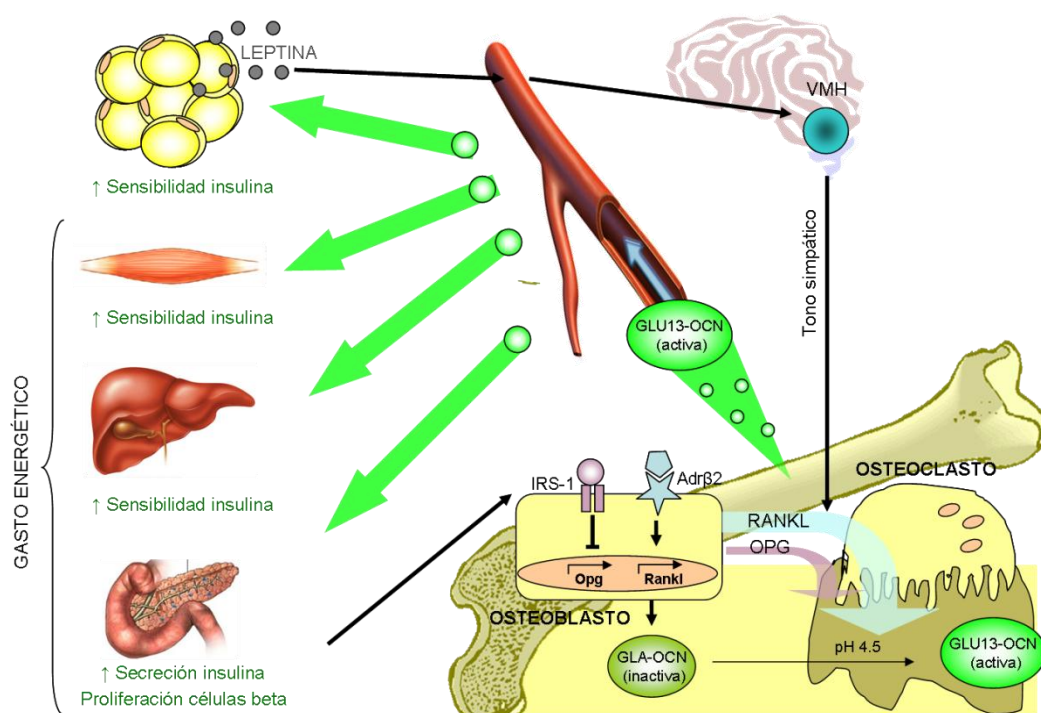


Fig. 1. Regulación coordinada de la remodelación ósea y el gasto energético mediante leptina y osteocalcina.

Recientemente se ha identificado al propio hueso como un órgano endocrino fundamental en la regulación del metabolismo energético (Karsenty and Ferron, 2012). El tejido óseo media dicha regulación a través de una molécula secretada específicamente por los osteoblastos, la osteocalcina, que es activada en la matriz ósea como consecuencia del pH ácido generado durante la resorción osteoclástica. La osteocalcina activada entra en la circulación y actúa estimulando tanto la secreción de insulina y la proliferación de células  $\beta$  en el páncreas, como la sensibilidad a insulina en músculo, hígado y tejido adiposo blanco (Aonuma et al., 2009; Fernandez-Real et al., 2009; Ferron et al.; Hwang et al., 2009; Im et al., 2008; Kanazawa et al., 2009; Kindblom et al., 2009; Lee et al., 2007; Levinger et al.; Pittas et al., 2009; Rached et al.; Winhofer et al.; Yeap et al.). Por tanto, el proceso de remodelación ósea es un mecanismo integral del sistema que gobierna la regulación del metabolismo energético en los vertebrados.

## 2.1. Adipocitos de la médula ósea

Los adipocitos constituyen una parte integral de la médula ósea. Neumann fue el primero en describir su presencia en muestras de autopsias de médula, y propuso que los elementos hematopoyéticos dentro de la médula (médula roja) son reemplazados por grandes

células amarillas durante el envejecimiento del esqueleto humano (Neumann, 1882). Posteriormente se reconoció a estas células como adipocitos y numerosos estudios mostraron la ausencia de grasa medular en distintos desórdenes hematopoyéticos, así como una aumentada adiposidad en la médula debida a químicos o radiación. Además se determinó que las mujeres osteoporóticas de edad avanzada tienen una abundante adiposidad en la médula, y que ésta está directamente relacionada con la edad y negativamente relacionada con el volumen de hueso trabecular (Meunier et al., 1971). Con estos datos, en humanos se ha considerado tradicionalmente a la grasa medular como un relleno para los huecos dejados por el hueso trabecular durante el envejecimiento o tras irradiación (Gimble, 1990; Gimble et al., 1996; Payne et al., 2007; Tavassoli, 1984).

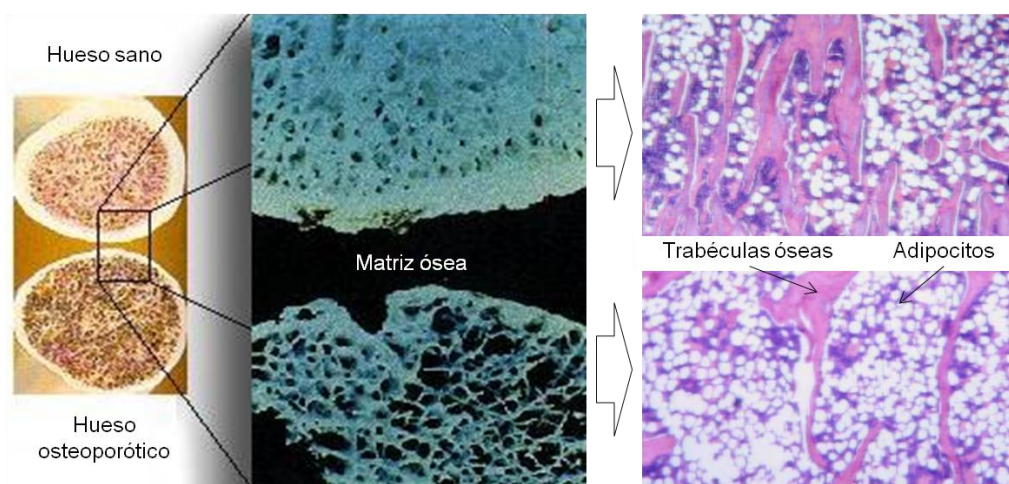
La principal función del tejido graso extramedular (grasa visceral y grasa subcutánea) es regular la homeostasis energética mediante el almacenaje (tejido adiposo blanco) y disipación (tejido adiposo marrón) de energía, así como mediante la secreción de hormonas circulantes encargadas de regular el metabolismo energético en otros órganos. En contraste con estos depósitos de grasa, la función de la grasa medular es prácticamente desconocida. Sin embargo, sabemos que este tejido tiene un fenotipo mixto de grasa blanca y marrón, pues su perfil de expresión génica indica que estos adipocitos poseen actividad tanto de almacenaje como de disipación de energía, además de actividad endocrina (Krings et al.; Shockley et al., 2009; Shockley et al., 2007). El análisis genético indica además que la respuesta de la grasa medular a factores ambientales y hormonales debe ser similar a la de otros depósitos de grasa (Shockley et al., 2009). Esta información ha llevado a sugerir un papel para estos adipocitos como moduladores del microambiente medular mediante la secreción de factores paracrinós y actuando como un reservorio energético localizado, dando soporte, entre otros, al proceso de remodelación ósea (Ducy; Gimble et al., 2006), que requiere un gran aporte energético.

La adipogénesis de la médula ósea es un proceso postnatal; el número de adipocitos en la médula aumenta con la edad de manera que en el esqueleto apendicular de adultos la mayor parte del espacio de la médula está ocupado por grasa. Así, se ha descrito que el contenido adiposo de la médula aumenta desde el 40% a los 30 al 70% a los 100 años, mientras que el volumen óseo disminuye un 12% (Justesen J., 2001). Además del tejido óseo, el tejido hematopoyético es también reemplazado por grasa con la edad (Burkhardt et al., 1987). De hecho, se ha sugerido un papel para los adipocitos como reguladores negativos del microambiente hematopoyético (Belaid-Choucair et al., 2008; Gimble, 1990; Naveiras et al., 2009; Ookura et al., 2007) y las adipoquinas secretadas por ellos, como leptina y adiponectina, son conocidos reguladores de la hematopoyesis (DiMascio et al., 2007; Mikhail

et al., 1997; Yokota et al., 2003; Yokota et al., 2002). Pero además del envejecimiento, otras condiciones como osteoporosis, inmovilización, microgravedad, menopausia (y ovariectomía) o diabetes, alteran la adipogénesis conduciendo a un incremento en el contenido adiposo de la médula asociado a una disminución en el volumen óseo (Belin de Chantemele et al., 2004; Burkhardt et al., 1987; Cohen et al.; Forsen et al., 1999; Glass et al., 2005; LeBlanc et al., 2000; Meunier et al., 1971; Minaire et al., 1984; Wronski et al., 1986). Por tanto, existe una relación inversa entre la producción de adipocitos en la médula y la formación/mantenimiento de la masa ósea, aunque su causalidad y bases celulares y moleculares son desconocidas por el momento.

### 3. Adipogénesis vs. Osteoblastogénesis en MSCs. Mecanismos reguladores

Los mecanismos reguladores del desarrollo de adipocitos y osteoblastos desde las MSCs dentro del entorno trabecular de la médula han sido extensamente estudiados en la última década. Se han identificado numerosos factores de transcripción y diversas rutas de señalización en las MSCs que regulan los estrechamente ligados procesos de adipogénesis y osteoblastogénesis (Kawai et al., 2009; Muruganandan et al., 2009; Nishimura et al., 2008).

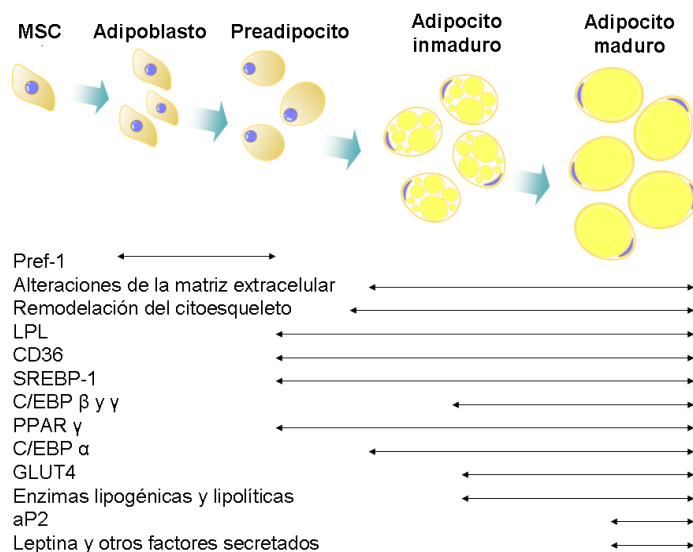


**Fig. 2.** Disminución de la masa ósea e incremento en la adiposidad de la médula en el hueso osteoporótico.

Se ha demostrado que los inductores de la diferenciación a lo largo de un linaje a menudo inhiben la diferenciación hacia el otro; por ejemplo, el factor de transcripción PPAR $\gamma$ 2 (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 2*), principal inductor de la adipogénesis, inhibe la

osteoblastogénesis (Grey et al., 2007; Khan and Abu-Amer, 2003; Lecka-Czernik et al., 2002), mientras que los inductores de la diferenciación osteoblástica BMP2 (*bone morphogenetic protein 2*) y Wnt suprimen la función de PPAR $\gamma$ 2 durante la osteoblastogénesis de las MSCs (Takada et al., 2007).

La diferenciación de adipocitos tiene lugar vía una serie de eventos transcripcionales bien definidos que implican a varios factores de transcripción clave. Está demostrado el papel fundamental de las proteínas PPAR $\gamma$  y de varios miembros de la familia de C/EBPs (*CCAAT/enhancer-binding proteins*) en la regulación de la adipogénesis, así como la participación en este proceso de, entre otros, la vía Wnt, y los factores Kruppel (KLF), AP-1 y SREBP-1 (Lefterova and Lazar, 2009; White and Stephens). Estas proteínas, en su conjunto, son las responsables de regular la expresión de los genes implicados en el establecimiento del fenotipo celular del adipocito (Fig. 5) (Cartwright et al., 2007). En contraste con la diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros, la diferenciación de adipocitos desde las MSCs es bastante desconocida y aparentemente compleja.



**Fig. 3.** Expresión génica durante la adipogénesis de MSCs.

Igualmente, la diferenciación de MSCs en osteoblastos está dirigida por la acción de otros factores de transcripción clave (Aubin., 2002). El factor de transcripción Cbfa1/Runx-2 es específico de osteoblasto y es imprescindible para la diferenciación de osteoblastos desde las MSCs, actuando en las fases tempranas. Otro factor de transcripción fundamental en la diferenciación osteoblástica es Osterix, un factor de transcripción también específico

de osteoblasto que actúa en las etapa más tardías de la diferenciación, siendo también imprescindible para que esta tenga lugar (Yang and Karsenty, 2002).



### 3.1. Señalización Wnt/ $\beta$ -catenina

La importancia del sistema regulador Wnt/ $\beta$ -catenina para la biología ósea ha empezado a cobrar luz desde que dos observaciones clínicas mostraron un profundo impacto en el esqueleto de ciertas alteraciones en la señalización Wnt. Una mutación en el correceptor de Wnt Lrp5 que lleva a una señal constitutivamente activada resulta en una mayor masa ósea (Boyden et al., 2002; Little et al., 2002), mientras que una mutación dominante negativa en este mismo correceptor se asocia con un fenotipo de baja masa ósea (Gong et al., 2001). Otras investigaciones con distintas mutaciones que conducen a una alteración en la masa ósea han resultado en la identificación de esclerostetina (Balemans et al., 2001), dkkopf-1 (Tian et al., 2003) y sFRP1 (*secreted frizzled-related protein 1*) (Bodine et al., 2004), todas ellas moléculas que interfieren con la unión de Wnt. El mismo correceptor LRP5 se ha propuesto además como el principal regulador mecánico de la masa ósea (Sawakami et al., 2006). La mayoría de los efectos de estas moléculas pueden explicarse por su capacidad de regular la activación de  $\beta$ -catenina en localizaciones y secuencias temporales específicas, de manera que distintas mutaciones que amplifican o disminuyen la señalización  $\beta$ -catenina resultan en cambios en la masa ósea (Rubin J., 2010). Una de las acciones de  $\beta$ -catenina que ha de estar implicada en su control de la masa ósea es su papel determinante en la diferenciación de MSCs hacia osteoblasto o adipocito (Akune et al., 2004). Se ha descrito que Wnt reprime la adipogénesis en preadipocitos 3T3-L1 incrementando la concentración intracelular de  $\beta$ -catenina, lo que promueve además la entrada de estas células en el linaje osteoblástico (Kennell and MacDougald, 2005). Además,  $\beta$ -catenina es absolutamente requerida para esta regulación de la adipogénesis y la osteoblastogénesis por los ligandos Wnt, tanto en células 3T3-L1 (Cawthorn et al.) como en MSCs (Sen et al., 2008). Por tanto, los niveles de  $\beta$ -catenina accionable responden a la integración de múltiples señales del microambiente y representan un punto determinante en la entrada de MSCs en los linajes adipogénico u osteogénico.

La proteína  $\beta$ -catenina puede encontrarse en dos locaciones celulares distintas, lo que determina su papel dual en la función celular. Un *pool* de  $\beta$ -catenina está asociado a la membrana plasmática mediante la unión a E-cadherina y  $\alpha$ -catenina en las uniones adherentes. En esta localización  $\beta$ -catenina es un componente esencial de la unión, y se acumula aquí cuando no hay señales que activen su translocación nuclear (Cadigan and Peifer, 2009). Esta participación de  $\beta$ -catenina en la adhesión célula-célula contribuye al desarrollo de los vertebrados a través de la regulación de distintos procesos (Stepniak et al., 2009), papel que está empezando a ser estudiado también en el desarrollo esquelético. Mucha más atención ha recibido el *pool* de  $\beta$ -catenina soluble del citoplasma, el cual, tras el

estímulo apropiado, se transloca al núcleo e interacciona con los factores de transcripción Tcf/Lef (*T-cell factor/lymphoid enhancer factor-1*). La disponibilidad de  $\beta$ -catenina en el citoplasma es regulada por la destrucción de un complejo constituido por Axina, GSK-3 $\beta$  y APC. La fosforilación constitutiva de  $\beta$ -catenina por GSK-3 $\beta$  marca a  $\beta$ -catenina para su degradación en la ruta ubiquitina/proteosoma, limitando los niveles de  $\beta$ -catenina citoplasmática. Del mismo modo, la estabilización de  $\beta$ -catenina en el citoplasma, disponible para translocarse al núcleo, depende de la inhibición de la fosforilación de  $\beta$ -catenina por GSK-3 $\beta$ . En la señalización Wnt canónica, la unión del ligando Wnt a su receptor transmembrana frizzled y el correceptor LRP5/6 lleva a la disrupción del complejo de destrucción de  $\beta$ -catenina (MacDonald et al., 2009), acumulándose ésta en el citoplasma. No obstante, aunque la activación de  $\beta$ -catenina se ha asociado tradicionalmente con la señalización a través esta ruta canónica de Wnt, múltiples vías de señalización, como las activadas por insulina/IGF-1, TNF $\alpha$  o E2, regulan la disponibilidad de  $\beta$ -catenina. Por tanto, es importante determinar qué factores y rutas de señalización controlan la actividad de  $\beta$ -catenina en las células óseas.

### 3.2. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y factores FoxO (*forkhead boxO*)

Como exponíamos antes, el decline en la masa ósea acompañado de un incremento en la adiposidad medular es un marcador invariable del envejecimiento en humanos. Como en otros tejidos, el decline en la masa ósea relacionado con la edad está asociado a un incremento en el estrés oxidativo en el hueso (Almeida et al., 2007b; Jilka et al.). En concordancia, la administración de diferentes antioxidantes previene la pérdida ósea causada por ovariectomía en ratones (Almeida et al., 2007b; Jagger et al., 2005; Lean et al., 2003) y el incremento en la apoptosis de osteoblastos asociado a la edad (Jilka et al.). Además, tanto el número de osteoblastos como la formación ósea están disminuidos en ratones tratados con un inhibidor del antioxidante celular glutathione (Jagger et al., 2005) y distintos modelos murinos de envejecimiento prematuro asociado con daño oxidativo presentan osteoporosis (de Boer et al., 2002; Tyner et al., 2002). Por otra parte, se ha demostrado que las ROS juegan un importante papel durante las primeras etapas de la diferenciación adipogénica, tanto en preadipocitos 3T3-L1 (Lee et al., 2009) como en MSCs (Kanda et al.), donde la eliminación de ROS o de la NAD(P)H oxidasa Nox4 resulta en una deficiente diferenciación adipogénica. Por tanto, las señales oxidativas en la médula parecen tener un papel fundamental en el cambio en el ratio osteoblastos/adipocitos de la médula que caracteriza el envejecimiento del tejido óseo.

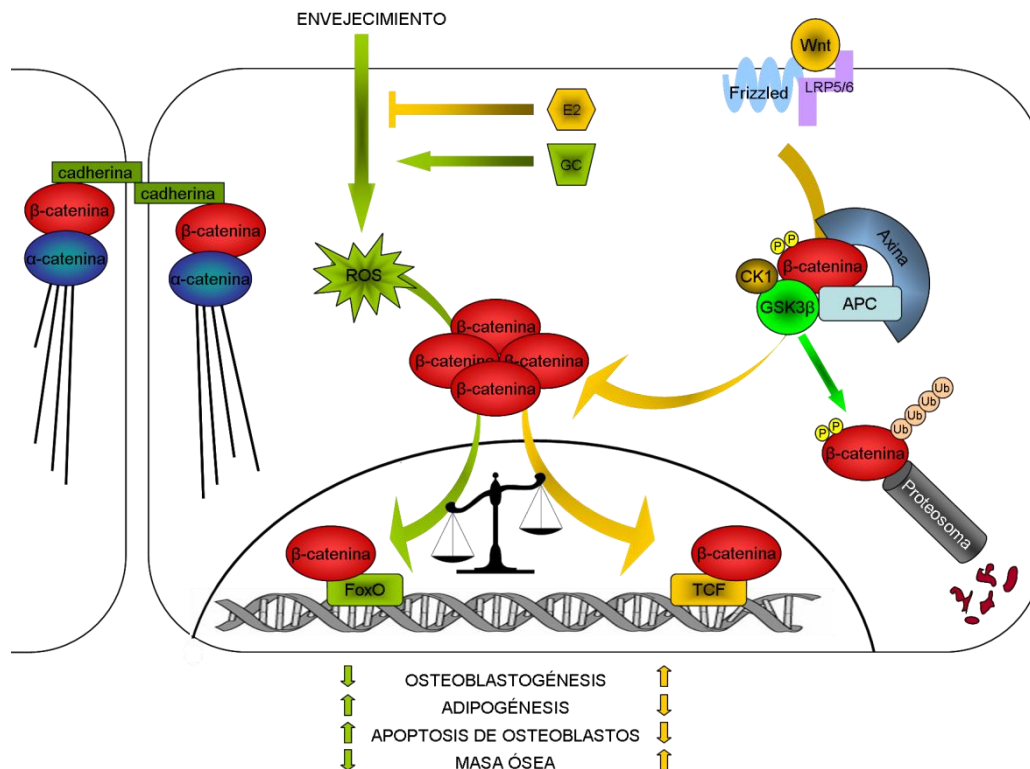


Por su conocido papel en la apoptosis, tradicionalmente se ha asumido que las ROS son subproductos dañinos de la vida aerobia que dañan proteínas, lípidos y ADN conduciendo a la muerte celular. Sin embargo, a niveles más bajos que aquellos que causan daño, las ROS son activamente producidas (y eliminadas) dentro de las células para dirigir cascadas de señalización que últimamente causan la oxidación reversible de proteínas en residuos de cisteína (Janssen-Heininger et al., 2008). Estas oxidaciones regulan ERK, JNK, p38, PI3K/AKT, p53, fosfatasas de tirosinas, proteasas, adaptadores moleculares y chaperonas, la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina, así como la actividad de distintos factores de transcripción incluidos NF- $\kappa$ B, AP-1, los receptores de glucocorticoides y estrógenos y HIF-1 $\alpha$  (Janssen-Heininger et al., 2008). Las principales fuentes intracelulares de ROS son los peroxisomas, las lipooxigenasas, el complejo NAD(P)H oxidasa y las reacciones de la cadena mitocondrial. Los electrones libres generados en las distintas reacciones son añadidos al oxígeno molecular generándose superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot-}$ ). De estas moléculas, el  $H_2O_2$  tiene la mayor actividad oxidativa, la mayor estabilidad y la mayor concentración molar intracelular, y representa una señal crítica para los cambios en la expresión génica que conducen al envejecimiento y al desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad (Giorgio et al., 2007; Huang and Manton, 2004; Mates and Sanchez-Jimenez, 1999).

Los factores de transcripción FoxO representan una subclase de proteínas *forkhead* caracterizadas por la presencia de un dominio de unión al ADN llamada *forkhead box*. En mamíferos, esta subclase comprende cuatro miembros: FoxO1 (FKHR), FoxO3 (FKHRL1), FoxO4 (AFX) y FoxO6 (Greer and Brunet, 2005). La expresión de FoxO 1, 3, y 4 es ubicua y relativamente abundante en las células óseas. La expresión de FoxO6, sin embargo, está restringida al cerebro (Jacobs et al., 2003). Los factores FoxO son integradores principales de la señalización celular que traducen estímulos ambientales como cambios hormonales, inflamación y estrés oxidativo en respuestas de expresión génica que dirigen eventos celulares como la diferenciación y la apoptosis. El interés inicial en los FoxO surgió de la evidencia de que estos factores promueven la resistencia al estrés y extienden la longevidad en *C.elegans* y *Drosophila* (Arden, 2008; Puig and Mattila). Aunque el papel de los FoxO en la longevidad todavía no se ha descrito en mamíferos, trabajos genéticos recientes indican que estos factores pueden reducir el impacto del daño tisular relacionado con la edad en varias patologías, incluidas neurodegeneración, enfermedades metabólicas y cáncer (Partridge and Bruning, 2008), activando la defensa frente al estrés oxidativo (Sahin and Depinho). Además, la delección de FoxO en ratones adultos jóvenes incrementa el estrés oxidativo en el hueso y recapitula los efectos adversos del envejecimiento en el esqueleto (Ambrogini et al.; Rached et al.).

## Señalización FoxO, estrés oxidativo y envejecimiento

FoxO 1, 3 y 4 son negativamente regulados por insulina y factores de crecimiento vía la quinasa AKT (Calnan and Brunet, 2008), que fosforila directamente a los FoxO. Esta fosforilación promueve la unión de FoxO a la chaperona 14-3-3 en el núcleo, lo que inhibe la unión de estos factores al ADN y promueve su exportación del núcleo y su acumulación en el citoplasma. Además, la insulina y los factores de crecimiento también bloquean la acción de FoxO promoviendo su degradación mediada por el proteosoma, disminuyendo así los niveles celulares de proteínas FoxO.



**Fig. 4.** Señalización β-catenina en el balance osteoblastogénesis/adipogénesis de MSCs y en la regulación de la masa ósea. Regulación por ROS y señalización Wnt.

En contraste con los factores de crecimiento, la señalización ROS conduce a la retención nuclear de FoxO y a la activación de su función transcripcional. En el núcleo, los factores FoxO pueden interaccionar con distintos factores de transcripción, como Runx2, p53 o el receptor de estrógenos (Calnan and Brunet, 2008; Teixeira et al.; Yang et al.). Asimismo, los FoxO interaccionan con β-catenina que, además de su importante papel en promover la transcripción mediada por Tcf/Lef, es un coactivador esencial de la familia FoxO (Almeida et al., 2007a; Essers et al., 2005). El estrés oxidativo, como opuesto a la señalización de insulina y factores de crecimiento, promueve la unión de FoxO a β-catenina y la activación de la

transcripción promovida por FoxO. Se ha sugerido que la transcripción mediada por estos complejos  $\beta$ -catenina/FoxO, en detrimento de los complejos  $\beta$ -catenina/TCF, media los efectos negativos en el esqueleto del estrés oxidativo asociado a la edad (Manolagas SC., 2007; Galli C., 2011; Almeida M., 2011). Además, esta interacción entre  $\beta$ -catenina y FoxO está conservada en la evolución; en *C.elegans* el ortólogo de  $\beta$ -catenina, BAR-1, es requerido para la actividad transcripcional del ortólogo de FoxO, DAF-16, en respuesta a las señales oxidativas (Essers et al., 2005).

Aunque requiere mayor investigación, todas estas evidencias proporcionan detalles moleculares de los mecanismos implicados en el desarrollo de la involución esquelética con la edad en respuesta al incrementado estrés oxidativo en las células óseas.

### **3.3. Estrógenos**

Los estrógenos, hormonas sexuales femeninas junto con la progesterona, son una familia de compuestos esteroideos que incluyen tres subtipos principales; estrona,  $17\beta$ -estradiol (E2) y estriol. El E2 es el estrógeno circulante predominante en la mujer premenopáusica, mientras que la estrona y el estriol circulan a concentraciones menores y tienen una menor contribución en las acciones de los estrógenos durante la vida adulta. La estrona parece importante en mujeres postmenopáusicas y los niveles más altos de estriol circulantes se detectan durante el embarazo.

La señalización celular en respuesta a estradiol implica acciones tanto genómicas como no genómicas. Los efectos genómicos de E2 son bien conocidos y están dirigidos por la unión del ligando a los receptores de estrógenos ( $ER\alpha$  y  $ER\beta$ ) intracelulares para directamente regular la transcripción de genes diana. En contraste, los efectos no genómicos de E2 no requieren la regulación de la transcripción génica por ERs, sino que actúan a través de rutas de transducción de señales. Los estrógenos cuentan también con un receptor asociado a proteínas G específico, conocido como GPR30. Tras ser activado por la unión de estrógenos, GPR30 induce la elevación de AMPc y la movilización del calcio intracelular (Filardo et al., 2007; Funakoshi et al., 2006; Revankar et al., 2007).

#### **3.3.1. Síntesis y acción de estrógenos en la médula ósea**

La deficiencia de estrógenos tras la menopausia es considerada como el principal determinante del desarrollo de osteoporosis en mujeres tras este periodo. Se ha sugerido que

los estrógenos protegen al esqueleto adulto frente a la pérdida ósea disminuyendo la tasa de remodelación ósea y manteniendo el balance entre la formación y la resorción del hueso (Manolagas, 2000; Manolagas et al., 2004; Manolagas et al., 2002). Se ha mostrado que la pérdida de estrógenos o andrógenos puede actuar disminuyendo las defensas frente al estrés oxidativo en el hueso (Manolagas). Además, la disminución de los niveles de DKK1 (inhibidor de la señalización Wnt) en ratas aboga el efecto negativo de la ovariectomía sobre la masa ósea (Wang et al., 2007), indicando un papel fundamental de la señalización Wnt en los efectos de los estrógenos sobre el tejido óseo. Recientemente se ha mostrado que la delección de ER $\alpha$  en el SNC resulta en un fenotipo de alta masa ósea, indicando que la señalización central de estrógenos tiene un impacto negativo en el hueso (Ohlsson et al.). Por tanto, los estrógenos regulan la masa ósea actuando tanto periférica como centralmente.

La biosíntesis de E2 desde esteroides C19 (testosterona y androstenediona) es catalizada por el enzima aromatasa citocromo P450 codificada por el gen CYP19. Además de las gónadas, este enzima se encuentra en diferentes órganos, incluidos tejido adiposo, cerebro, piel, endotelio y hueso. Las células esqueléticas expresan, además de CYP19, otras enzimas implicadas en el metabolismo de esteroides sexuales (Compston, 2002; Ishida et al., 2002; Issa et al., 2002; Janssen et al., 1999; Schweikert et al., 1980; Schweikert et al., 1995), lo que soporta el concepto de que andrógenos y estrógenos activos pueden ser sintetizados y metabolizados en las células de la médula ósea. Luego, además de contribuir al *pool* de estradiol circulante, los estrógenos sintetizados en el tejido óseo pueden ejercer acciones locales de una manera paracrina o autocrina (Labrie et al., 1997; Simpson et al., 2000; Simpson and Davis, 2001). Distintas evidencias indican la existencia de un control estrogénico de la diferenciación de las MSCs medulares, favoreciendo la osteoblastogénesis y reprimiendo la adipogénesis, lo que podría estar implicado en el cambio en el ratio adipocito/osteoblasto en la médula que acompaña a la pérdida de estrógenos (Gambacciani et al., 1997).

### 3.4. Glucocorticoides

La administración de glucocorticoides es una terapia antiinflamatoria efectiva y muy usada en distintas enfermedades crónicas (como asma o artritis reumatoide) y para evitar el rechazo de transplantes. Sin embargo, distintos efectos adversos a menudo limitan su uso, entre ellos, el desarrollo de osteoporosis. Se ha descrito que la administración prologanda de glucocorticoides conduce a un mayor número de osteoclastos y adipocitos, una disminución de la proliferación y diferenciación de precursores de osteoblastos, y un aumento en la

apoptosis tanto de osteoblastos como de osteocitos maduros (Pierotti et al., 2008; Wang et al., 2008). Además, la inhibición tanto de GSK-3 $\beta$  como de DKK-1 aboga la inducción por glucocorticoides de la pérdida de masa ósea a través de la activación de  $\beta$ -catenina (Wang et al., 2009; Wang et al., 2008). Por otro lado, se ha mostrado que la dexametasona activa factores FoxO en osteoblastos vía una cascada de señalización ROS/JNK, lo que conduce a la inhibición de la señalización Wnt y a una disminuida osteoblastogénesis (Almeida et al.). Por tanto, la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina media las acciones de los glucocorticoides en el tejido óseo.

A nivel molecular, los glucocorticoides se unen a receptores intracelulares en el citoplasma (receptores de glucocorticoides, GR), que entonces migran al núcleo y se unen a secuencias específicas del ADN, regulando la transcripción génica (Rhen and Cidlowski, 2005). El GR unido a ligando también regula la transcripción indirectamente a través de la interacción con otras rutas de señalización, tanto en el citoplasma como en el núcleo. A este respecto, la familia AP-1 de factores de transcripción (proteínas Fos/Jun) exhibe múltiples interacciones con los receptores nucleares de hormonas esteroideas (Pfahl, 1993), siendo el ejemplo mejor caracterizado las interacciones AP-1/GR (Diamond et al., 1990; Kerppola et al., 1993; Schule et al., 1990; Shemshedini et al., 1991; Yang-Yen et al., 1990). GR modula la actividad de AP-1 a través de interacciones directas proteína-proteína en distintos tejidos como glándula adrenal de rata (Smith et al., 1996), cerebro de ratón (Terzic et al., 2003) y fibroblastos primarios humanos (Jacques et al.). En hMSCs, recientemente se ha propuesto un modelo en el que la interacción entre c-Jun y GR regula el potencial osteogénico y adipogénico de estas células (Carcamo-Orive et al.).

## 4. Serotonina

En 1948, Rapport y su grupo descubrieron la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), buscando los vasoconstrictores responsables de la hipertensión y la llamaron así por su presencia en el suero (*sero*) y sus propiedades vasoactivas (*tonina*) (Rapport et al., 1948). La serotonina es una monoamina sintetizada principalmente en las células enterocromafines del tracto gastrointestinal (Furness and Costa, 1982) y en las neuronas serotoninérgicas del sistema nervioso central (Fuller and Wong, 1990). Las acciones de la serotonina central y la circulante están dissociadas (Sjoerdsma, 1959; Sjoerdsma and Palfreyman, 1990), ya que la serotonina no puede cruzar la barrera hematoencefálica. La mayor parte de la serotonina (en torno al 95%) es producida en la periferia, mientras que sólo una pequeña fracción es

sintetizada en el cerebro, donde sus acciones han recibido la mayor atención y, por tanto, son mejor conocidas. La serotonina liberada a la circulación desde las células enterocromafines del tracto gastrointestinal es rápidamente captada por las plaquetas vía el transportador específico de serotonina (5-HTT) y almacenada en los gránulos densos, que constituyen casi el total de la serotonina circulante. La serotonina circulante entra en la vena portal y es metabolizada principalmente en el hígado (Green and Curzon, 1968), fundamentalmente por acción del enzima monoamino oxidasa (MAO). Éste convierte la 5-HT en ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA) vía desaminación oxidativa (Molinoff and Axelrod, 1971). El 5-HIAA del SNC es activamente transportado a la periferia donde es excretado en la orina junto con el 5-HIAA periférico.

La serotonina es sintetizada desde el aminoácido esencial triptófano. Primero, el L-triptófano es hidroxilado a 5-hidroxitriptófano (5-HTP) por el enzima triptófano hidroxilasa (Tph), reacción que constituye el paso limitante en la síntesis de serotonina. El 5-HTP es después convertido a 5-HT vía el enzima L-amino ácido descarboxilasa. Hasta hace unos años se conocía un único enzima Tph, codificado por el gen *tph1*. Ahora sabemos que existen dos isoformas de este enzima, Tph-1 y Tph-2, que son responsables de la síntesis de la serotonina no-neural y neural, respectivamente (Walther and Bader, 2003; Walther et al., 2003). El hecho de que la serotonina sea sintetizada central y periféricamente por proteínas codificadas por dos genes distintos crea la oportunidad de estudiar separadamente el papel de cada *pool* de serotonina usando modelos genéticos.

### 4.1. Señalización serotoninérgica

Se han descrito un total de 14 receptores para la 5-HT en humanos. Éstos se han dividido en 7 clases (5-HT<sub>1-7</sub>), definidas por su estructura y por las rutas de transducción de señales a las que están acoplados (Alexander et al., 2008). Además, pueden existir varias isoformas para el mismo subtipo de receptor serotoninérgico como resultado de *splicing* alternativos y procesamiento del ARNm. Todos los receptores de 5-HT son receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCRs), con excepción del receptor 5-HT<sub>3</sub>, que es un canal iónico activado por ligando (Hoyer et al., 2002). Además, la duración e intensidad de la señal serotoninérgica es mediada por el transportador específico de 5-HT (5-HTT), una proteína transportadora dependiente de cloruro sódico que controla la concentración extracelular de serotonina. Todos los GPCRs de 5-HT tienen una homología estructural, con un dominio N-terminal extracelular, siete hélices  $\alpha$  transmembrana y un dominio C-terminal intracelular. Tras la unión del ligando a la parte extracelular del receptor, éste inicia la activación de la proteína

G asociada. Las proteínas G son estructuras heterotriméricas compuestas por subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Se clasifican por el tipo de subunidad  $\alpha$  que contienen, y existen cuatro tipos: Gs, Gi, Gq and G12/13. Cada proteína G inicia su propia ruta de transducción de señales, de modo que la función celular de un GPCR es últimamente determinada por la proteína G que tenga acoplada. Así, la subunidad Gs estimula la actividad adenilato ciclasa (AC) mientras que la subunidad Gi inhibe esta proteína. Las subunidades Gq y G12/13 activan la fosfolipasa C (PLC) y pequeñas proteínas G, respectivamente.

Receptor	Tipo	Mecanismo
5-HT1	GPRC acoplado a Gi/Go	Disminución de AMPc
5-HT2	GPRC acoplado a Gq/G11	Incremento de $\text{Ca}^{2+}$
5-HT3	Canal $\text{Na}^+/\text{K}^+$ activado por ligando	Despolarización
5-HT4	GPRC acoplado a Gs	Incremento de AMPc
5-HT5	GPRC acoplado a Gi/Go	Disminución de AMPc
5-HT6	GPRC acoplado a Gs	Incremento de AMPc
5-HT7	GPRC acoplado a Gs	Incremento de AMPc

**Tabla 1.** Receptores de serotonina y mecanismos de señalización acoplados.

- La clase 5-HT1 de receptores comprenden 5 subtipos (5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E y 5-HT1F) con una homología de secuencia del 40-63%. Todos los receptores 5-HT1 están acoplados a la proteína Gi. Por tanto, la estimulación del receptor inhibe la AC y disminuye la producción de AMPc. Todos los subtipos de receptor 5-HT1 son expresados tanto en el SNC como en la periferia; sin embargo, el papel fisiológico de los receptores 5-HT1E y 5-HT1F aún debe ser determinado. En el contexto de las células de hueso y sus precursores, se ha descrito la expresión de los receptores 5-HT1A (Blizotes et al., 2006; Blizotes et al., 2001; Collet et al., 2008), 5-HT1B (Yadav et al., 2008) y 5-HT1D (Blizotes et al., 2001) en osteoblastos primarios y distintas líneas celulares osteoblásticas.
- Los subtipos de receptor 5-HT2 incluyen los receptores 5-HT2A, 5-HT2B y 5-HT2C, que muestran una homología de secuencia del 46-50%. Estos receptores están acoplados a la proteína Gq, señalizando vía activación de PLC para generar inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) y 1,2-diacylglicerol. En consecuencia, estos segundos mensajeros incrementan la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Se ha mostrado la expresión de receptores 5-HT2 en varios de los tipos celulares que integran la médula ósea. Los receptores 5-HT2A y 5-HT2B se han encontrado en osteoblastos primarios (Blizotes et al., 2001; Collet et al., 2008; Hirai et al., 2009; Westbroek et al., 2001; Yadav et al., 2008), distintas líneas celulares osteoblásticas (Blizotes et al., 2006; Blizotes et al., 2001; Hirai et al.; Locker et al., 2006), osteocitos (Westbroek et al., 2001), osteoclastos (Gustafsson et al., 2006) y la



línea celular adipocítica 3T3-L1 (Kinoshita et al.; Stunes et al.; Uchida-Kitajima et al., 2008). Aunque existen discrepancias en cuanto a la expresión de algunos receptores, todos estos trabajos indican la presencia de 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2B</sub> tanto en osteoblastos como en adipocitos.

- Además de los receptores mencionados, se ha descrito la expresión del transportador 5-HTT en osteoblastos primarios y líneas celulares osteoblásticas (Hirai et al.; Hirai et al., 2009), osteoclastos (Battaglini et al., 2004; Gustafsson et al., 2006) y en preadipocitos 3T3-L1 (Stunes et al.).

## 4.2. Papel de la serotonina en la fisiología del esqueleto

Los principios activos medicamentosos cuyas dianas son receptores o transportadores de serotonina se desarrollaron con el fin de tratar distintos trastornos del SNC. Éstos son la segunda generación de agentes antipsicóticos (SGAs) y los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRIs). El uso de estos agentes se ha incrementado en las últimas décadas y de esta amplia utilización se han desprendido importantes efectos adversos metabólicos y esqueléticos, lo que ha proporcionado el empuje para el estudio de la conexión serotonina-status metabólico-SNC-esqueleto. Por otra parte, el sorprendente descubrimiento de que *Tph-1* es uno de los genes más marcadamente *up*-regulados en ratones deficientes en *Lrp-5*, con un fenotipo de baja masa ósea, ha llevado a una serie de estudios que han demostrado un papel fundamental de la señalización serotoninérgica en la regulación de la masa ósea (Yadav et al., 2008). Los SGAs, como la risperidona, han sido ampliamente usados para tratar problemas de comportamiento en desórdenes del espectro autista y en síntomas psicóticos agudos, debido a su efectividad y a la baja tasa de efectos adversos comparados con la primera generación de drogas antipsicóticas (Kuroki et al., 2008). Sin embargo, se acumulan evidencias de que deben tener serios efectos metabólicos adversos a largo plazo, incluidos ganancia de peso, apetito nocturno y síndrome metabólico (Grunder et al., 2009). Con respecto al esqueleto, se ha descrito una alta tasa de fracturas de cadera en individuos bajo estas medicaciones (Howard et al., 2007). Como los SGAs actúan como potentes bloqueadores del receptor 5-HT<sub>2A</sub> y débiles inhibidores del receptor D<sub>2</sub> de dopamina (Meltzer et al., 1989), estos datos sugieren que la inhibición de la señalización de serotonina a través de este receptor tiene efectos negativos en el esqueleto. Apoyando esta hipótesis, se ha mostrado que ratones tratados con risperidona tienen una significativa pérdida de hueso trabecular debida a un incremento en la resorción ósea (Motyl et al.), además de una aumentada adiposidad en la médula. Los SSRIs, como la fluoxetina, que se han empleado extensamente para tratar la depresión, también se



han asociado recientemente con una pérdida de masa ósea y con un incremento en la tasa de fracturas (Bolton et al., 2008; Calarge et al.; Diem et al., 2007; Liu et al., 1998; Richards et al., 2007; Vestergaard et al., 2008; Ziere et al., 2008). En concordancia, los ratones *knockout* para 5-HTT presentan un fenotipo de baja masa ósea (Yadav VK., 2009). Los SSRIs actúan inhibiendo el 5-HTT, lo que provoca un incremento en la concentración local de serotonina en el espacio pericelular prolongando la señal serotoninérgica; sin embargo, su uso crónico reduce el contenido de serotonina en las plaquetas un 80-95% (Maurer-Spurej et al., 2004). Por tanto, hay que ser cauto a la hora de interpretar estos datos clínicos sobre el uso de SSRIs.

#### 4.2.1. Regulación de la masa ósea por la serotonina periférica (intestino)

Se ha demostrado que la inhibición condicional de Tph-1 en el intestino de ratones resulta en un fenotipo de alta masa ósea con niveles muy bajos de serotonina circulante, lo que indica un efecto negativo de la serotonina procedente del intestino sobre la masa ósea (Yadav et al., 2008). Estos efectos esqueléticos se han atribuido a la señalización mediada por el receptor 5-HT1B osteoblástico, cuya activación disminuye la proliferación de los osteoblastos (Yadav et al., 2008). Además, la delección global de 5-HT2B en ratones conduce a un fenotipo de baja masa ósea consecuencia de una disminución en la proliferación, diferenciación y capacidad osteogénica de los osteoblastos (Collet et al., 2008). También se ha descrito una disminuida diferenciación de osteoclastos en ratones Tph-1<sup>-/-</sup> deficientes en serotonina (Chabbi-Achengli et al.). Luego, todos los datos indican la existencia de un complejo control de la serotonina sobre las células responsables de la adquisición/mantenimiento de la masa ósea.

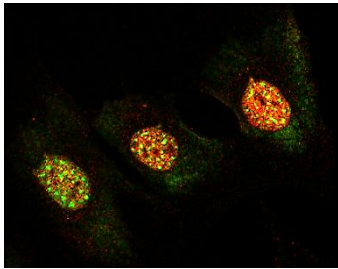
#### 4.2.2. Regulación de la masa ósea por la serotonina central (SNC)

El papel de la serotonina del SNC como regulador de la remodelación se hace patente en los ratones Tph2<sup>-/-</sup> (Yadav et al., 2009). Estos ratones muestran una ausencia completa de serotonina en el cerebro y un contenido normal de serotonina en sangre. El fenotipado esquelético revela una baja masa ósea resultado de una menor formación y una mayor resorción ósea, indicando que la serotonina del SNC tiene un papel regulador positivo en la adquisición de masa ósea. En los ratones Tph2<sup>-/-</sup>;Adrb2<sup>+/-</sup> se rescata este fenotipo de baja masa ósea de los ratones Tph2<sup>-/-</sup> (Yadav et al., 2009). También la delección de Htr2c (5-HT2C, receptor más expresado en el hipotálamo) conduce a un fenotipo de baja masa ósea acompañado de un incremento en la actividad simpática, y este fenotipo se rescata al expresar Htr2c específicamente en las neuronas del hipotálamo ventromedial (VMH). Luego,

estos datos indican que la serotonina del SNC regula la adquisición esquelética a través de la supresión del tono simpático mediante la activación de 5-HT<sub>2C</sub> en las neuronas del VMH.

#### **4.2.3. Regulación de la masa ósea por leptina: control de la síntesis de serotonina en el SNC**

La disminución en la masa ósea trabecular por acción de la leptina es mediada a través de la activación indirecta del sistema nervioso simpático vía neuronas del VMH (Ducy et al., 2000; Kawai et al., 2009; Takeda et al., 2002). La lesión química de estas neuronas conduce a un incremento de la masa ósea, recapitulando el fenotipo observado en los ratones ob/ob (carentes de leptina). En estos ratones ob/ob la expresión de Tph-2 está incrementada y la infusión intracerebroventricular de leptina disminuye esta expresión. La leptina suprime por tanto la actividad de las neuronas serotoninérgicas, pero esto no ocurre en ratones que carecen del receptor de leptina en estas neuronas, ratones que además muestran un fenotipo de alta masa ósea (Dhillon et al., 2006). Estos datos, junto con los estudios que muestran la actividad pro-osteogénica de la señalización serotoninérgica en los núcleos del VMH, indican que el papel de la leptina en la regulación de la masa ósea es mediado por la inhibición de la síntesis de serotonina a través de su receptor expresado en las neuronas serotoninérgicas que residen en el bulbo raquídeo.



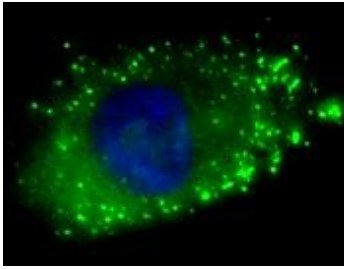
## *Objetivos*



La prevalencia de las enfermedades degenerativas se incrementa con la esperanza de vida, afectando en la actualidad a un gran número de individuos. La osteoporosis, caracterizada por una baja masa ósea en los huesos largos y vertebras y alteraciones en el equilibrio celular de la médula ósea, es una de las enfermedades degenerativas más prevalentes en la actualidad. Los últimos trabajos que demuestran el papel fundamental del esqueleto óseo en la regulación del metabolismo energético de los vertebrados, y en el que la señalización serotoninérgica cumple un papel clave, dan lugar a un gran número de preguntas que ahora deben ser investigadas: ¿cómo actúa la serotonina en las células de la médula ósea?, ¿cómo integran las células del nicho medular los distintos estímulos para dirigir respuestas concretas?, ¿cuáles son los mecanismos celulares y moleculares responsables?, ¿por qué hay citopenia ósea y aumento en la adiposidad medular durante el envejecimiento y tras la menopausia?, ¿qué papel/es cumplen los adipocitos como integradores del nicho medular?. En este trabajo hemos estudiado la acción de la serotonina en cultivos primarios de células progenitoras MSC de médula ósea humana, planteando los siguientes objetivos concretos:

1. Caracterizar la expresión del sistema serotoninérgico en las hMSCs.
2. Determinar las rutas de señalización dirigidas por la serotonina en las hMSCs.
3. Estudiar la posible implicación de la serotonina en la diferenciación adipocítica de hMSCs y los mecanismos moleculares implicados.
4. Estudiar si la respuesta de las hMSCs a serotonina se ve alterada en función de la presencia/ausencia de estrógenos en los cultivos.
5. Analizar el papel de la señalización ROS/FoxO y  $\beta$ -catenina en la adipogénesis de hMSCs, así como su posible regulación por serotonina y estrógenos.
6. Valorar la diferenciación osteoblástica de hMSCs en respuesta a serotonina.





## ***Materiales y Métodos***





## 1. Cultivo de hMSCs

Los cultivos de células madre mesenquimales se obtuvieron a partir de muestras de médula ósea de hombres sanos. Contamos con muestras de 36 donantes cedidas por el Dr. Rañada del Hospital La Princesa (Madrid) o procedentes de los bancos de células de la Fundación Jimenez Diaz (Madrid) y la Universidad de Málaga. Las hMSCs se aislaron mediante gradiente de Percoll según el protocolo del Dr. Arnold I. Caplan (Caplan., 1991). Las células se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) de baja glucosa (1 g/L) (DMEM-LG) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), glutamina 2mM, 0,01% de streptomycin y 0,06% de penicilina G (medio de crecimiento). Los cultivos se mantuvieron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 97% de humedad relativa. Los pases se realizaron cuando la confluencia celular alcanzaba aproximadamente el 80% y para los distintos experimentos se utilizaron cultivos con entre 3 y 10 pases.

## 2. Ensayos de diferenciación

Los ensayos de diferenciación se llevaron a cabo siguiendo la metodología descrita en anteriores trabajos (Pittenger 2009). Las células se cultivaron en medio de crecimiento hasta alcanzar una densidad aproximada del 70-80% para la diferenciación osteogénica y del 100% para la diferenciación adipogénica. Seguidamente se lavaron 2 veces con tampón fosfato salino (PBS) y se cultivaron en el medio de diferenciación correspondiente.

Para inducir la diferenciación adipogénica, el medio de crecimiento fue reemplazado por DMEM de alta glucosa (4,5 g/L) (DMEM-HG) suplementado con 10% de FBS, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) 0,5 mM (SIGMA), dexametasona 1 µM (SIGMA), ITS (10 µg/ml de insulina, 10 µg/ml de transferrina, 10 ng/ml de ácido selenioso, 2 mg/ml de albúmina, 8,56 µg/ml de ácido linoleico) (Collaborative Research), indometacina 100 µM (SIGMA), 0,01% de streptomycin y 0,06% de penicilina G (medio de inducción adipogénica, AIM).

La diferenciación osteogénica fue inducida mediante cultivo en DMEM-LG con glutamina 2 mM, ITS, piruvato 1mM (Gibco), aminoácidos no esenciales 400 µM, 40 µg/ml de ácido ascórbico (WAKO), dexametasona 1nM, β-glicerol fosfato 1 mM, 0,01% de streptomycin y 0,06% de penicilina G (medio de inducción osteogénica OIM).

### 3. Ensayos de proliferación y viabilidad celular

La proliferación celular se estimó por incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina, determinación de Ki67 mediante inmunocitoquímica y mediante el ensayo colorimétrico MTT. Se sembraron  $1,5 \times 10^4$  células en placas de cultivo M24 y se mantuvieron en medio de crecimiento durante 24 horas. A continuación, las células se lavaron 2 veces con PBS, se incubaron durante otras 24 horas en medio mínimo (medio de crecimiento sin FBS) y seguidamente se expusieron durante 72 horas al estímulo hormonal correspondiente. Los ensayos se diseñaron para realizar triplicados de cada muestra y como control positivo valoró la proliferación en medio de crecimiento. Los resultados se han expresado en porcentaje de incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina, de expresión de Ki67 o de formación de formazán respecto al control (unidades relativas).

- \* Para determinar la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina las últimas 24 horas de cultivo se realizaron en presencia de 1  $\mu$ Ci/ml de [<sup>3</sup>H]-timidina. A continuación, se eliminó la radiactividad no incorporada en las nuevas células y se provocó la lisis celular mediante incubación a -20°C en 200  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O por pocillo. La radiactividad contenida en el H<sub>2</sub>O se midió en un contador de centelleo beta.
- \* Para la determinación de la proteína Ki67, que se expresa en todas las fases del ciclo celular excepto en G<sub>0</sub>, se realizó una inmunocitoquímica según figura en el siguiente apartado. Para valorar la proliferación alcanzada en cada condición se contaron un total de 500 células por condición.
- \* El ensayo MTT se basa en la capacidad de las células viables de convertir una sal de tetrazolio, el MTT [*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenylterazolum bromide*], en un producto final azul, el formazán, por acción de las deshidrogenasas mitocondriales. Para este ensayo se añadió 5mg/ml de MTT durante las últimas 4 horas de cultivo. A continuación se retiró el medio y se añadieron 400  $\mu$ l de HCl 4 mM con 0,1% de Nonidet P-40 (NP40) en isopropanol (MERCK). Después de 1 hora de solubilización, la absorbancia de cada muestra se determinó a 590 nm y utilizando un filtro de referencia de 620 nm (SmartSpec™ Plus BIO-RAD).

### 4. Cuantificación de la adhesión celular a sustrato de fibronectina

Se prepararon sustratos de fibronectina en placas M24 incubando éstas durante 1 hora a 37°C con 20 mg/ml de fibronectina en PBS, y a continuación se sembraron  $2,0 \times 10^5$  células por pocillo. Tras una incubación de 30 minutos, se retiraron las células no adheridas y se

realizaron 3 lavados con PBS a 37°C con agitación. Las células adheridas al sustrato fueron fijadas con formaldehído (MERCK) al 3,7% en PBS durante 30 minutos y teñidas con solución cristal violeta (5 mg/ml en 2% etanol) durante 10 minutos. Finalmente, las muestras se lavaron 4 veces con H<sub>2</sub>O con agitación y se dejaron secar completamente. El cristal violeta se diluyó mediante incubación en H<sub>2</sub>O con 2% SDS durante 30 minutos y se cuantificó la absorbancia a 550 nm. Cada condición se ensayó por triplicado y se realizaron tres experimentos independientes.

## 5. Ensayo de migración celular por herida

Se cultivaron hMSCs en placas M12 hasta alcanzar una confluencia celular del 100%. Entonces se ayunaron de FBS durante 24 horas y a continuación, se realizó una raya sobre el cultivo usando una punta amarilla, simulando una herida. Seguidamente se realizaron 2 lavados con PBS a 37 °C con agitación para eliminar las células desprendidas y se añadió medio mínimo con el estímulo correspondiente, analizándose cada condición por triplicado. Tras 24 horas de incubación, las células se fijaron con formaldehído al 3,7% en PBS y se valoró la migración alcanzada en cada caso. Nuevamente, los resultados son representativos de tres ensayos independientes.

## 6. RT-PCR

La purificación de ARN de los cultivos de hMSCs se realizó por el método de fenol/metacresol (Ogueta., 2002). Para cada condición, se obtuvo el ARN de hMSCs crecidas en 2 placas p100 (aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  células). El ARN total precipitado fue disuelto en H<sub>2</sub>O y tratado durante 30 minutos a 37 °C con 35 unidades de *DNasa* libre de *RNasa* (Roche) en 60 µl de buffer de reacción (NaAc 1 M y MgSO<sub>4</sub> 0,1 M). A continuación, se realizó una segunda purificación con fenol/metacresol y se resuspendió el ARN obtenido en 20 µl de H<sub>2</sub>O con 0,1% DEPC (libre de *RNasas*). La síntesis del ADN complementario se realizó mediante reacción de retrotranscripción con 2,5 µg de ARN. La reacción se desarrolló en un volumen de 20 µl de una solución que contenía Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM dNTPs 500 nM (Biotools), 250 ng/ml de cebador (Invitrogen), DTT 10 mM (Invitrogen) y 200 unidades de retrotranscriptasa (Invitrogen). Se incubó 5 minutos a 65°C, 1 hora a 42°C y 15 minutos a 70°C. Para cada reacción de PCR se utilizó 1 µl de la reacción de retrotranscripción junto con 6,25 picomoles de cada oligonucleótido (sentido y antisentido)

(Tabla 2), dNTPs 200  $\mu$ M y 0,5 unidades de ADN polimerasa (Biotools) en una solución compuesta por Tris-HCl 75 mM pH 9,0,  $MgCl_2$  2 mM, KCl 50 mM,  $(NH_4)_2SO_4$  20 mM y 5% de DMSO, en un volumen final de 25  $\mu$ l. Los fragmentos amplificados se resolvieron en geles de agarosa al 1,5% y se marcaron mediante incubación de los geles en EtBr para su visualización bajo luz UV.

GEN	Número de acceso	Secuencia oligonucleótido (5' → 3')		Tm (°C)	Tamaño producto
<b><math>\beta</math>-actina</b>	NM_0011101	S	GCATGGAGTCCTGTGGCATCCACG	60	355
		A	GGGTGTAACGCAACTAAGTCATAG		
<b>c/ebp<math>\alpha</math></b>	NM_004364	S	CACCTGCAGTTCCAGATCG	64	243
		A	GTA CTGTTGCTGTTCTTGTCCAC		
<b>PPAR<math>\gamma</math>2</b>	NM_015869	S	ATGGGTGAAACTCTGGGAGAT	60	325
		A	CCACTTTGATTGCACTTTGGT		
<b>FABP4 (aP2)</b>	NM_001442	S	TCCTGGTACATGTGCAGAAATGGG	67	164
		A	CAATGCGAACTTCAGTCCAGGTCA		
<b>LPL</b>	NM_000237	S	ACAGGAATGTATGAGAGTTGGGT	62	329
		A	GCTTCTGCATACTCAAAGTTAGG		
<b>ADIPOQ (Adiponectina)</b>	NM_004797 NM_001177800	S	ATGGTCCTGTGATGCTTTGA	57	229
		A	GTTGAGTGCGTATGTTATTTTT		
<b>SLC2A4 (GLUT-4)</b>	NM_001042	S	CTGGGCCTCACAGTGCTAC	63	128
		A	GTCAGGCGCTTCAGACTCTT		
<b>LEP (leptina)</b>	NM_000230	S	GTAGAGTTTGAAGGAGGTGA	55	349
		A	CTGGGAATTAGCCATTGTG		
<b>IL6</b>	NM_000600	S	GAGAAAGGAGACATGTAACAAGAGT	60	388
		A	GCGCAGAATGAGATGAGTTGT		
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	NM_000594	S	CTGTACCTCATCTACTCCCAGGTC	63	279
		A	AGACTCGGCAAAGTCGAGATAGT		
<b>MAOA</b>	NM_000240	S	GCCAAGATTCACTTCAGACCAGAG	66	368
		A	TGCTCCTCACACCAGTTCTTCTC		
<b>MAOB</b>	NM_000898	S	ATATGGAAGGGTTCTACGCC	61	558
		A	AAACTGGTGAAACAGAACGC		
<b>SSAO</b>	NM_003734	S	ATGGTCATCGTGACAGCAGC	65	346
		A	CTCAGGAGGGACAGCAGTGA		
<b>TPH1</b>	NM_004179	S	CCCTTTGATCCCAAGATTAC	60	211
		A	CATTCATGGCACTGGTTATG		
<b>SLC6A4 (5-HTT)</b>	NM_001045	S	TGGACCTGGGCAATGTCTGG	65	149
		A	TCCATTTCCGGTGGTACTGTCCC		
<b>HTR1A (5-HT1A)</b>	NM_000524	S	ACAGGTA CTGGCCATCACG	65	114
		A	GCGGGATAGAGATGAGGAAGC		
<b>HTR1B (5-HT1B)</b>	NM_000863	S	TCACCGACCTGCTTGTGTCC	67	160
		A	TCCAGGGCGATGACACAGAG		

<b>HTR2A</b> <b>(5-HT2A)</b>	NM_000621	S	TCTTTAGCTTCCTCCCTCA	63	182
		A	AAGAAAGGGCACCACATCAC		
<b>HTR2B</b> <b>(5-HT2B)</b>	NM_000867	S	AGCCAATCCAGGCCAATCAA	67	201
		A	AGGCAGCCAGTGAGCCAAAG		
<b>HTR2C</b> <b>(5-HT2C)</b>	NM_004179	S	TCCCTAGCCATTGCTGATATGC	67	160
		A	CGCAGAGGTGCATGATGGAC		
<b>CYP19A1</b> <b>(Aromatasa)</b>	NM_000240	S	CGGCAGCAAACCTGGGCTGC	55	126
		A	CAGGCCGGGGCCTGACAGAG		
<b>ESR1</b> <b>(ER<math>\alpha</math>)</b>	NM_000125	S	GAAGTGGGAATGATGAAAGGTG	64	543
	NM_001122740/1/2	A	GCCAGACGAGACCAATCATCAG		
<b>ESR2</b> <b>(ER<math>\beta</math>)</b>	NM_001040276	S	CTGAATCTGACGCTCAGCAG	64	163
		A	CGGGTGACAAAATCCAGACT		

**Tabla 2.** Oligonucleótidos sentido (S) y antisentido (A) utilizados en las distintas reacciones de RT-PCR.

## 7. Inmunocitoquímica

Sembramos  $1,5 \times 10^4$  células por pocillo en placas M24 en las que previamente se habían depositado cubres pretratados durante al menos 1 hora con 0,5% de gelatina de piel bovina (SIGMA) en PBS. Tras 24 horas de cultivo o una vez alcanzadas las densidades celulares necesarias en los ensayos de diferenciación adipogénica, se añadieron los distintos tratamientos durante los tiempos indicados en cada caso. Seguidamente, las células se fijaron con formaldehído al 3,7% en PBS durante 30 minutos y se eliminó la autofluorescencia celular incubando las muestras durante 10 minutos en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM pH 8,0 en PBS. Después las células se incubaron en buffer de permeabilización ( $\text{NaCl}$  100  $\mu\text{M}$ , PIPES 10  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Mg}_2\text{Cl}$  3  $\mu\text{M}$ , EGTA 0,6  $\mu\text{M}$ , sacarosa 30  $\mu\text{M}$  y 0,5% Triton X-100) durante 30 minutos. Para eliminar las posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos (Tabla 3), se bloquearon las preparaciones con solución de bloqueo (1% BSA en PBS) durante 1 hora. Posteriormente se incubaron con los distintos anticuerpos primarios durante otra hora. A continuación, se lavaron las muestras 2 veces con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes. Se realizaron 3 lavados finales con PBS, se deshidrataron las muestras con etanol al 70% (Merck) y se montaron con Mowiol/Dabco (Calbiochem) sobre portas para su visualización en el microscopio de fluorescencia.

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial
<b>ST (C-20)</b>	1:200	Santa Cruz Biotechnology
<b>SR-1B (M-19)</b>	1:200	Santa Cruz Biotechnology

<b>SR-2A (A-15)</b>	1:200	Santa Cruz Biotechnology
<b>SR-2B (Y-15)</b>	1:200	Santa Cruz Biotechnology
<b>Tubulina</b>	1:200	Sigma-Aldrich
<b>Vinculina</b>	1:50	Chemicon International
<b>Vimentina</b>	1:2	Abcam
<b>*Faloidina-TRITC</b>	1:500	Sigma-Aldrich
<b>Ki67</b>	1:200	Neomarkers
<b>pERK1/2 (E-4)</b>	1:200	Santa Cruz Biotechnology
<b>c-FOS (4)</b>	1:200	Santa Cruz Biotechnology
<b>c-JUN (H-79)</b>	1:200	Santa Cruz Biotechnology
<b>ER Ab-10</b>	1:20	Thermo scientific
<b>GR (3D5)</b>	1:200	Santa Cruz Biotechnology
<b>C/EBP<math>\alpha</math> (K-19) X</b>	1:2000	Santa Cruz Biotechnology
<b>C/EBP<math>\beta</math> (C-19) X</b>	1:2000	Santa Cruz Biotechnology
<b>PPAR<math>\gamma</math> (E-8)</b>	1:200	Santa Cruz Biotechnology
<b>Adiponectina [19F1]</b>	1:500	Abcam
<b>B-catenina</b>	1:200	Santa Cruz Biotechnology
<b>FOXO</b>	1:100	Abcam
<b>STAT1 (E-23)</b>	1:200	Santa Cruz Biotechnology
<b>STAT3 (C-20)</b>	1:200	Santa Cruz Biotechnology
<b>STAT5 (C-17)</b>	1:200	Santa Cruz Biotechnology
<b>DAPI</b>	1:10000	Calbiochem
<b>Alexa 488 anti ratón</b>	1:500	Invitrogen
<b>Alexa 488 anti conejo</b>	1:500	Invitrogen
<b>Alexa 555 anti ratón</b>	1:500	Invitrogen
<b>Alexa 555 anti conejo</b>	1:500	Invitrogen
<b>Alexa 555 anti cabra</b>	1:500	Invitrogen

**Tabla 3.** Anticuerpos utilizados en los análisis inmunocitoquímicos.

## 8. Obtención de extractos proteicos

Para la obtención de extractos proteicos se realizaron cultivos de hMSCs en placas p100 (aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células para cada condición). Tras retirar el medio de cultivo, las células se lavaron 3 veces con PBS a 4°C. A continuación, el procedimiento fue distinto según los extractos proteicos a obtener:

### \* Extractos proteicos totales

Se recogieron las células con la ayuda de un rascador de plástico en 500 µl de tampón de lisis (Tris-HCl pH 7,4 50mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, 8% de glicerol; 1% de Triton X-100) conteniendo inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, 5 µg/ml de aprotinina, 4 µg/ml de pepstatina y 2 µg/ml de leupeptina) y de fosfatasas (NaF 50 mM,  $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$  30 mM y  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  2 mM). Las células resuspendidas en el tampón fueron homogeneizadas pasándolas 15 veces a través de una aguja de 23 G y manteniéndolas 15 minutos en un agitador orbital a 4°C. Los extractos proteicos se obtuvieron por centrifugación de los lisados celulares a 4°C durante 30 minutos a 13.000 rpm. El sobrenadante obtenido se analizó o se guardó en alícuotas a -70°C.

### \* Extractos proteicos de las fracciones citosólica y nuclear

Las células se recogieron con la ayuda del rascador de plástico en 500 µl de buffer A (HEPES 10mM pH 7,9, KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM y DTT 1mM) complementado con los inhibidores de proteasas y fosfatasas indicados antes. Las células resuspendidas en el tampón se mantuvieron 30 minutos en un agitador orbital a 4 °C. A continuación se añadió NP-40 a una concentración final del 1 %, se homogeneizó por agitación en vórtex durante 10 segundos y se centrifugaron las muestras a 13.000 rpm durante 1 minuto a 4 °C. El sobrenadante obtenido constituye la fracción citoplasmática de proteínas. El *pellet* resultante de esta centrifugación fue lisado en 25 µl de buffer C (HEPES 20mM pH 7,9, NaCl 400 mM, EDTA 0,2 mM, DTT 1mM y 16% glicerol) conteniendo los inhibidores de proteasas y fosfatasas. Las muestras se agitaron en vórtex durante 30 segundos y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante de esta última centrifugación representa la fracción proteica nuclear. Ambas fracciones, citosólica y nuclear, fueron directamente analizadas o guardadas en alícuotas a -70°C.

## 9. Análisis de proteínas mediante *Western-Blot*

La concentración de proteínas en cada muestra fue determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976). Las proteínas, en condiciones desnaturizantes y hervidas 2

minutos, fueron separadas por su peso molecular en geles SDS poliacrilamida al 10 %. Para su inmunodetección, las proteínas fueron transferidas en condiciones semihúmedas a membranas de nitrocelulosa (Amersham). A continuación, se bloquearon las membranas durante 1 hora con 3% de BSA en TBST (Tris 25 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, KCl 2 mM y 0,1% de Tween-20) y seguidamente se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 4) diluido TBST con 1% de BSA durante 15-20 horas a 4 °C. Después, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBST y se incubaron las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente con fragmentos (Fab)<sub>2</sub> conjugados con HRP (*horseradish peroxidase*), contra las IgGs o IgMs de conejo o ratón según correspondiese. Una vez realizados otros 3 lavados de 10 minutos con TBST, la reacción de la peroxidasa se desarrolló incubando las membranas con ECL (Amersham).

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial
<b>ERK1 (C-16)</b>	1:500	Santa Cruz Biotechnology
<b>pERK1/2</b>	1:500	Santa Cruz Biotechnology
<b>P38</b>	1:500	Santa Cruz Biotechnology
<b>pP38</b>	1:500	Santa Cruz Biotechnology
<b>c-FOS (K-25) X</b>	1:2000	Santa Cruz Biotechnology
<b>c-JUN (H-79) X</b>	1:5000	Santa Cruz Biotechnology
<b>Actina (I-19)R</b>	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
<b>STAT1 (E-23)</b>	1:500	Santa Cruz Biotechnology
<b>STAT3 (C-20)</b>	1:500	Santa Cruz Biotechnology
<b>STAT5b (G-2) X</b>	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
<b>GAM-HRP</b>	1:4000	Southern Biotechnology
<b>GAR-HRP</b>	1:4000	Southern Biotechnology
<b>RAG-HRP</b>	1:4000	Southern Biotechnology

**Tabla 4.** Anticuerpos utilizados en los los análisis de *Western-blot*.

## 10. Detección de ROS mediante marcaje con DCFDA

El DCFDA (*2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*) es un indicador de las especies reactivas de oxígeno (ROS) que permanece como no fluorescente hasta que las esterasas intracelulares eliminan los grupos acetato y se da la oxidación dentro de las células tratadas,



generándose el producto fluorescente DCF. Para determinar el contenido intracelular de ROS se sembraron hMSCs sobre cubres tapizados con gelatina colocados en placas M24. Al día siguiente, se incubaron las células con los distintos tratamientos durante 1 hora, estando los últimos 30 minutos de cultivo en presencia de DCFDA 30  $\mu$ M (SIGMA). A continuación, se realizaron 2 lavados con PBS, se fijaron las células durante 10 minutos con formaldehído al 3,7% en PBS a 4°C, se dejaron secar y se montaron para su visualización inmediata. La cantidad de DCF presente en cada muestra se determinó mediante cuantificación de la intensidad de señal de la imagen (CELL Imaging Software for Life Science Microscopy, OLYMPUS). Se cuantificó la señal DCF para un total de 100 células para cada condición.

## **11. Identificación y cuantificación de adipocitos**

### **11.1. Marcaje con Bodipy 488**

Para identificar las hMSCs diferenciadas en adipocitos marcamos las células con el marcador específico de los lípidos intracelulares Bodipy 488 (Invitrogen). Para ello, tras el periodo indicado de diferenciación de las hMSCs sobre cubres tapizados con gelatina, se fijaron las células con formaldehído al 3,7% en PBS durante 30 minutos y se incubaron con 1  $\mu$ g/ml de bodipy 488 en NaCl 150 mM durante 10 minutos. Para visualizar los núcleos se incluyó en esta incubación 1  $\mu$ g/ml de DAPI. Finalmente las muestras se lavaron 3 veces con PBS, se dejaron secar y se montaron con Mowiol/Dabco.

### **11.2. Marcaje con *Oil Red O* (ORO)**

La diferenciación adipogénica fue cuantificada utilizando el marcaje con ORO como indicador de la acumulación intracelular de lípidos. Para ello se sembraron hMSCs en placas M24 y se incubaron en AIM con los distintos suplementos hormonales e inhibidores específicos que se indican en los resultados. Como control negativo se utilizaron células mantenidas en medio de crecimiento. Tras 4 semanas de inducción adipogénica, las células fueron fijadas con formaldehído al 3,7% en PBS durante 1 hora y lavadas con isopropanol al 60%. A continuación, se dejaron secar y se incubaron con 2% de *Oil Red O* (SIGMA) en 60% isopropanol durante 10 minutos. Seguidamente se lavaron 4 veces con H<sub>2</sub>O, se dejaron secar y se eluyó el contenido de ORO mediante incubación en 500  $\mu$ l de isopropanol al 100% durante 10 minutos. La cantidad de ORO presente en cada muestra se determinó midiendo la absorbancia de estas muestras a 500 nm.

## **12. Identificación y cuantificación de osteoblastos**

### **12.1. Tinción de fosfatasa alcalina**

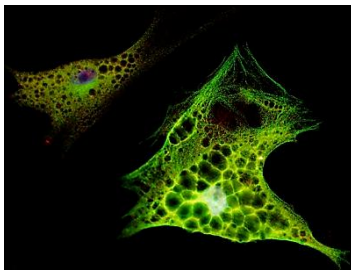
La actividad fosfatasa alcalina que caracteriza a los osteoblastos se visualizó usando naftol AS-MX fosfato según el método descrito por Ackerman (Ackerman, 1962). Como resultado de la actividad de la fosfatasa, el naftol AS-MX es liberado e inmediatamente acoplado con sal de diazonio, formando un pigmento insoluble visible en los sitios de actividad de la fosfatasa. Para esto, las células diferenciadas en placas M24 se fijaron con una solución de citrato/acetona (1 volumen de citrato 0,03 M y 3 volúmenes de acetona) durante 30 minutos. A continuación se realizó un lavado suave con H<sub>2</sub>O y se incubaron las muestras con una solución de sal de diazonio/naftol AS-MX fosfato durante 30 minutos en oscuridad. Seguidamente se tiñó con Hematoxilina de Mayer durante 10 minutos, se lavaron las muestras 3 veces con H<sub>2</sub>O y se dejaron secar para su visualización.

### **12.2. Cuantificación de la actividad fosfatasa alcalina mediante $\rho$ NPP**

Para cuantificar la actividad fosfatasa alcalina desarrollada en los cultivos osteogénicos utilizamos el sustrato p-nitrofenilfosfato ( $\rho$ NPP) (Sigma-Aldrich). La fosfatasa alcalina cataliza la hidrólisis del  $\rho$ NPP a pH 10,4, liberando p-nitrofenol y fosfato. La velocidad de formación del p-nitrofenol, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de fosfatasa alcalina en la muestra ensayada. Para este ensayo, tras lavar 4 veces los cultivos con 0,1 % de Tween-20 en PBS, se incubaron durante 30 minutos con  $\rho$ NPP 1 mM en oscuridad. La reacción se detuvo añadiendo NaOH a una concentración final de 0,5 M y seguidamente se midió la absorbancia a 450 nm.

## **13. Análisis estadístico**

La significación estadística entre las distintas condiciones experimentales se calculó mediante el test de la t de student, considerándose significativos los valores de  $p < 0.05$  con  $n \geq 3$ . Las diferencias significativas se representan mediante asteriscos, cuyo significado es \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



## ***Resultados***

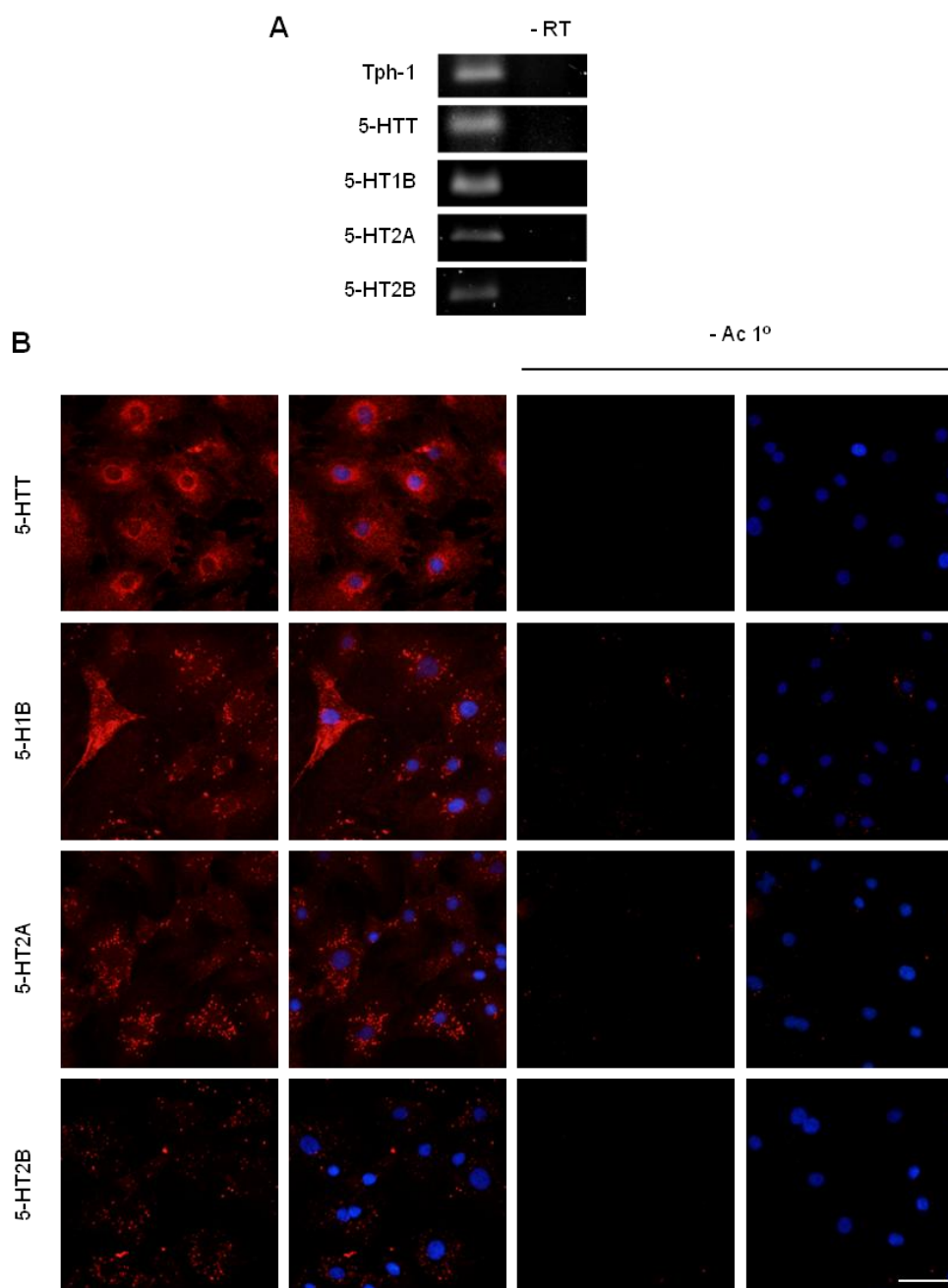


## 1. Respuesta a serotonina en MSCs obtenidas de médula ósea humana

### 1.1 Determinación de la expresión de genes y proteínas del sistema serotoninérgico en hMSCs

En la última década se ha descrito la expresión de distintos receptores serotoninérgicos y del transportador específico de 5-HT en distintos tipos celulares del nicho de la médula ósea, como osteoblastos primarios y clonales, osteocitos, osteoclastos y fibroblastos del periostio (Battaglini et al., 2004; Bliziotis et al., 2006; Bliziotis et al., 2001; Collet et al., 2008; Gustafsson et al., 2006; Hirai et al., 2009; Locker et al., 2006; Westbroek et al., 2001). Mientras que en los adipocitos medulares aún no ha sido descrita, sí se ha identificado la expresión de distintos receptores de 5-HT en adipocitos primarios de rata y en preadipocitos murinos 3T3-L1 (Kinoshita et al.; Stunes et al.). Los datos en las células troncales MSC son escasos; se ha descrito la expresión de 5-HT1A y 5-HT2A (Gustafsson et al., 2006), 5-HT2B (Jin et al., 2009) y 5-HTT (Trouche et al.). Con estos antecedentes, primeramente nos propusimos analizar la expresión de distintos componentes del sistema serotoninérgico en las MSCs humanas (hMSCs). Para ello cultivamos estas células en medio de crecimiento, aislamos su ARN total y analizamos mediante RT-PCR la expresión de: Tph-1, enzima para la síntesis de 5-HT fuera del SNC, 5-HTT, transportador específico de serotonina, y cinco receptores serotoninérgicos (5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT2A, 5-HT2B y 5-HT2C). Como se muestra en la Fig. 6A las hMSCs expresan los genes Tph-1, 5-HTT, 5-HT1B, 5-HT2A y 5-HT2B. Por el contrario, no se detectó ARNm para los receptores 5-HT1A y 5-HT2C. Con estos datos, quisimos comprobar la presencia de las respectivas proteínas para las que la RT-PCR resultó positiva. Con este propósito realizamos inmunocitoquímicas específicas para cada una de estas proteínas en hMSCs cultivadas en condiciones de crecimiento. La Fig. 6B muestra la expresión específica de 5-HTT, 5-HT1B, 5-HT2A y 5-HT2B en estos cultivos de hMSCs.

Los datos obtenidos muestran que el sistema serotoninérgico se encuentra en las células hMSCs, pudiendo ser uno de los ejes reguladores que operan en estas células en la médula humana adulta.

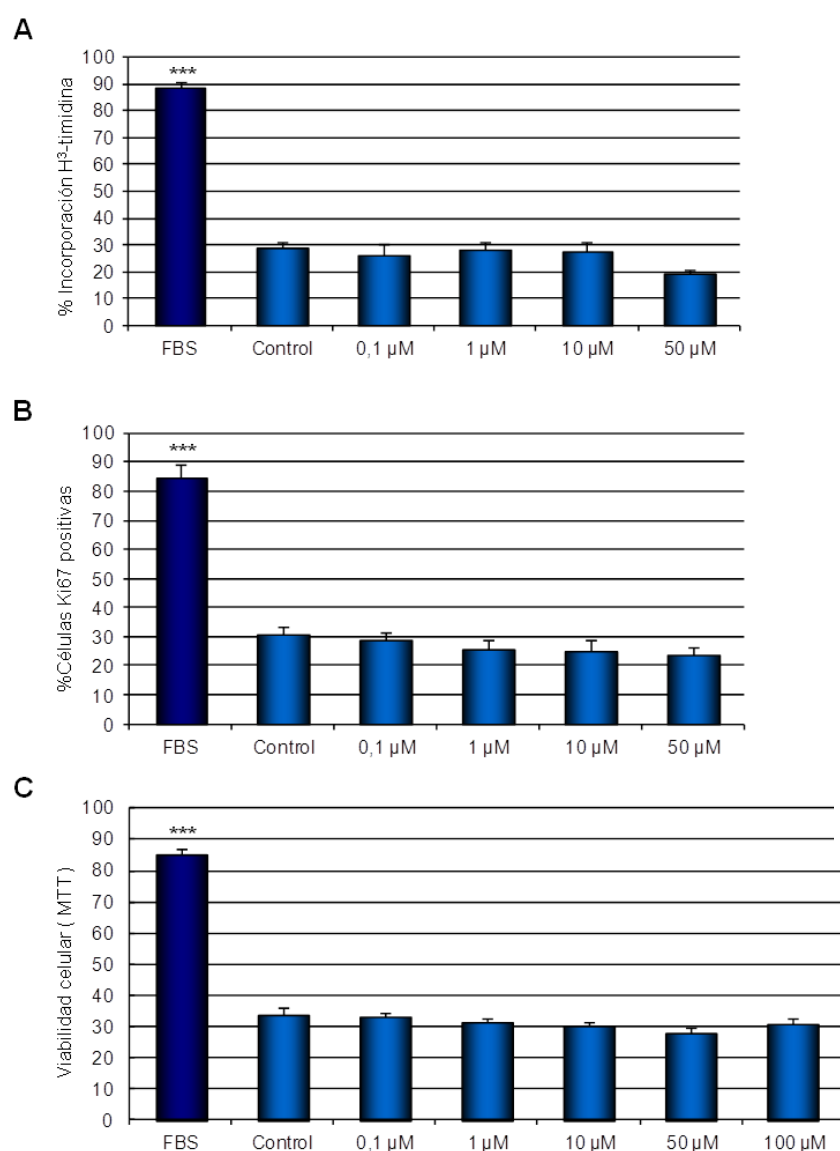


**Fig. 6. Las hMSCs expresan un sistema para sintetizar y responder a 5-HT.** Análisis de la expresión de los genes y proteínas del sistema serotoninérgico que se indican en la imagen mediante RT-PCR **(A)** e inmunocitoquímica con anticuerpos específicos **(B)**, respectivamente. Los núcleos aparecen marcados con DAPI y como control se muestran inmunocitoquímicas sin los distintos anticuerpos primarios (Ac 1°). En ambos casos (A y B) se emplearon hMSCs cultivadas en condiciones de crecimiento y los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

## 1.2. La 5-HT no altera la proliferación en los cultivos de hMSCs

Únicamente un estudio hace referencia a la acción de la serotonina sobre la proliferación de las MSCs (Gustafsson et al., 2006) e indica que no tiene un efecto

significativo en la proliferación de cultivos de origen humano. Por otra parte, el efecto mitogénico de la serotonina es bien conocido en distintos cultivos celulares como fibroblastos (Seuwen et al., 1988), células de músculo liso (Nemecek et al., 1986) y células endoteliales vasculares (Pakala et al., 1994). Con el fin de estudiar una posible acción de la 5-HT sobre la proliferación de hMSCs cultivamos éstas en medio mínimo (DMEM-LG) suplementado con concentraciones crecientes de 5-HT (0,1-100  $\mu$ M) durante 72 horas. Cada tratamiento se realizó por triplicado y como control positivo se utilizó el cultivo en medio de crecimiento. Seguidamente, la proliferación celular se determinó tanto por incorporación de H<sup>3</sup>-timidina al ADN como por análisis de la expresión de la proteína Ki67 mediante inmunocitoquímica, según se describe en *Materiales y Métodos*. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 7, donde se observa que la adición de 5-HT, en las concentraciones analizadas, no conduce a cambios significativos en la proliferación de los cultivos de hMSCs.



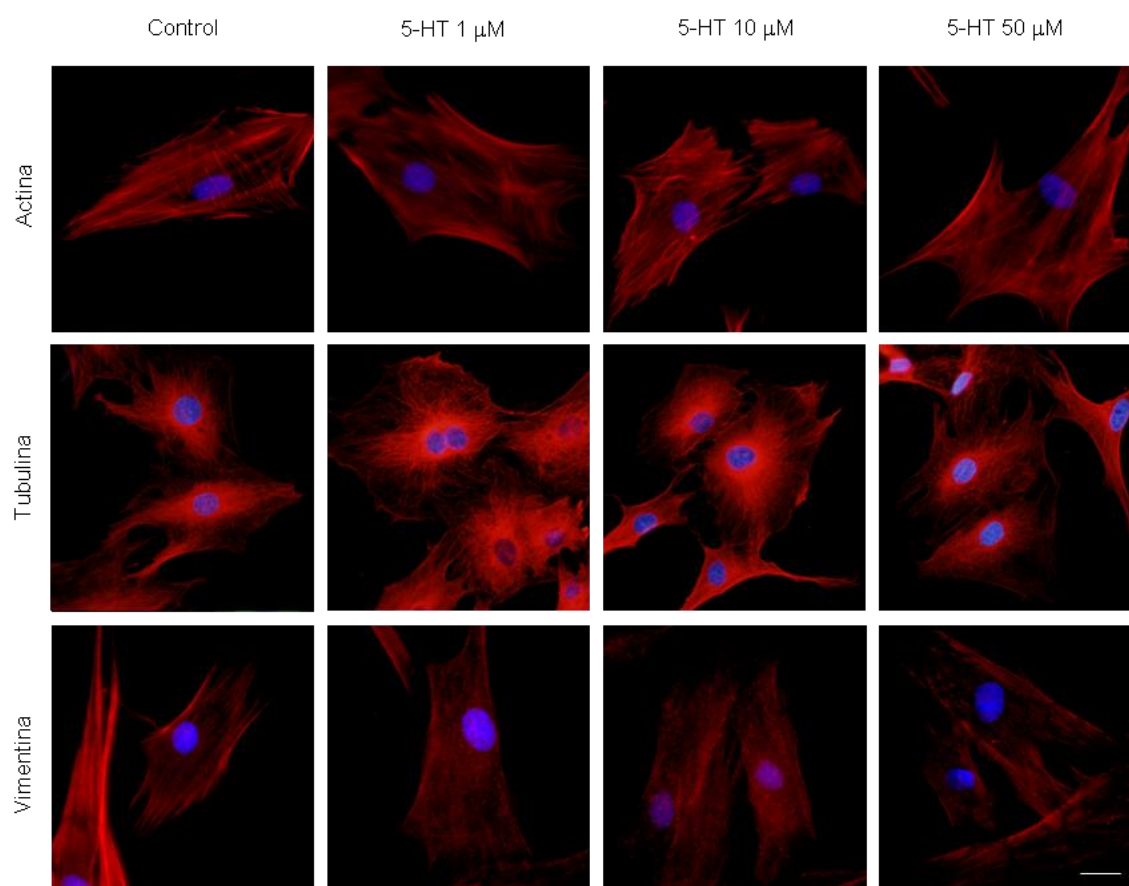
**Fig. 7. La 5-HT no altera significativamente la proliferación de hMSCs.** Análisis de la proliferación de hMSCs mantenidas durante 72 horas en medio mínimo (DMEM-LG) suplementado con concentraciones crecientes de 5-HT mediante incorporación de H<sup>3</sup>-timidina (**A**) y expresión de la proteína Ki67 (**B**). Análisis de la viabilidad celular mediante ensayo MTT en las mismas condiciones (**C**). Los resultados representan la media de tres experimentos independientes. Como control positivo se utilizó el suplemento con 10% de FBS.

Para descartar un posible efecto citotóxico de las altas concentraciones de 5-HT utilizadas, determinamos la viabilidad celular de los cultivos mediante un ensayo colorimétrico con MTT en las mismas condiciones experimentales que los ensayos de proliferación, analizando además una concentración más alta de 5-HT (100  $\mu$ M). Como muestra la Fig. 7C, no observamos variaciones significativas en la viabilidad de las hMSCs expuestas a 5-HT. Por tanto, los resultados muestran que la 5-HT, en una concentración 0,1-100  $\mu$ M, no altera significativamente ni la proliferación ni la supervivencia celular de los cultivos de hMSCs mantenidos en ausencia de otros estímulos (medio mínimo).

### 1.3 Análisis del citoesqueleto de hMSCs cultivadas en presencia de 5-HT

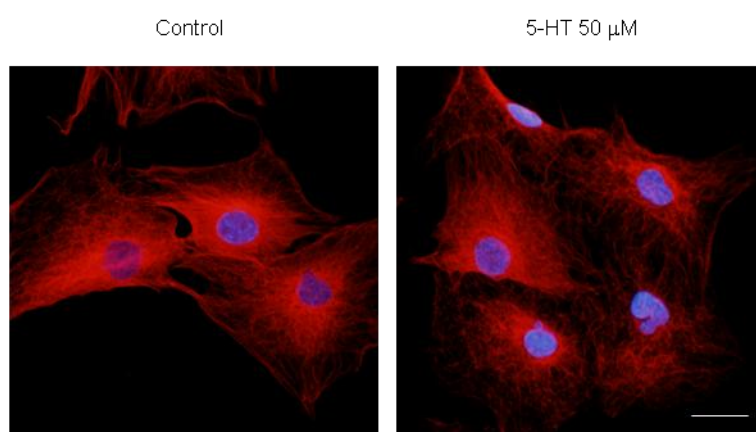
Conocidos los efectos de la 5-HT sobre la dinámica del citoesqueleto de distintos tipos celulares, quisimos conocer si las hMSCs responden también a serotonina con cambios en la organización de su citoesqueleto. Se sabe que la serotonina tiene un papel fundamental en la estabilidad de los microtúbulos de células neuronales (Bianchi et al., 2009; Yuen et al., 2005) y que induce la polimerización de las fibras de estrés de actina de las células endoteliales (Alexander et al., 1987; Mineau-Hanschke et al., 1989; Welles et al., 1985), así como que afecta a la estabilidad de los filamentos intermedios de vimentina en células de músculo liso (Li et al., 2006; Tang et al., 2005). Con este propósito, mantuvimos cultivos de hMSCs en medio mínimo suplementado con distintas concentraciones de 5-HT (1, 10 y 50  $\mu$ M) durante 72 horas. A continuación, realizamos inmunocitoquímicas separadas contra tubulina y contra vimentina. Para la visualización de los filamentos de actina utilizamos faloidina unida al fluoróforo Alexa 555. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 8. Puede apreciarse que la presencia de 5-HT no altera la organización de los microfilamentos de actina, visualizándose en todas las condiciones las fibras de estrés características de estos cultivos. Por el contrario, observamos cambios compatibles con una cierta despolimerización/desorganización de los filamentos de vimentina. Aunque en esta figura no se observan cambios llamativos en la organización de los microtúbulos de las hMSCs cultivadas con 5-HT, en la Fig. 9 puede apreciarse como, a corto plazo, el estímulo serotoninérgico induce la despolimerización de los microtúbulos en estas células. En este caso estimulamos las células con 5-HT 50  $\mu$ M durante 10 minutos.





**Fig. 8. Estudio del citoesqueleto de hMSCs cultivadas en presencia de 5-HT.** Inmunocitoquímica para tubulina y vimentina y marcaje de filamentos de actina con faloidina-Alexa 555 en hMSCs mantenidas durante 72 horas en DMEM-LG suplementado con las concentraciones de 5-HT indicadas. Los núcleos se muestran marcados con DAPI. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. Barra de escala 20  $\mu$ m.

Por tanto, estos datos indican que las hMSCs pueden responder al estímulo serotoninérgico. Además, los resultados muestran que la presencia de 5-HT en el medio de cultivo no conduce a cambios en la morfología fibroblástica característica de las MSCs en estas condiciones de cultivo en 2D.

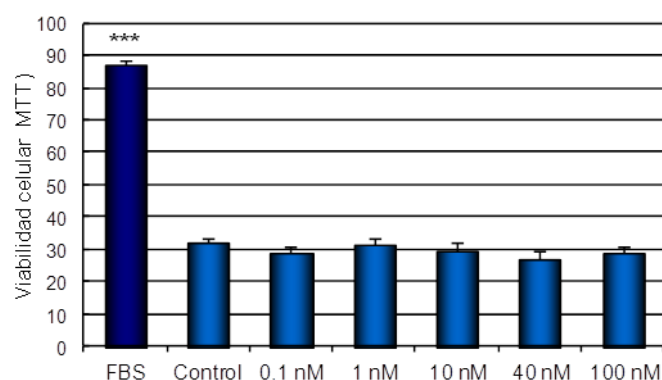


**Fig. 9. La 5-HT induce la despolimerización de microtúbulos en hMSCs.** Inmunocitoquímica para tubulina en hMSCs cultivadas en DMEM-LG (control) y estimuladas con 5-HT 50  $\mu$ M durante 10 minutos. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes y los núcleos aparecen marcados con DAPI. Barra de escala 20  $\mu$ m.

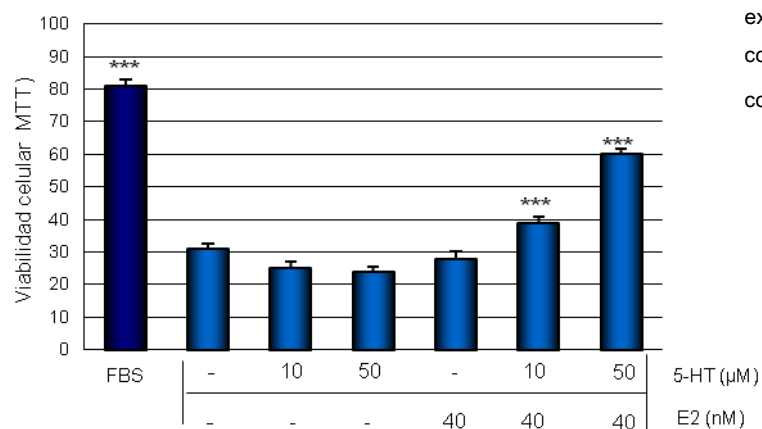
### 1.4 Acción sinérgica de 5-HT y E2 en la proliferación de hMSCs

Por su papel fundamental en la biología ósea y en los procesos de diferenciación de las MSCs (Bidwell JP., 2013), estudiamos la respuesta de las hMSCs a serotonina en función de la presencia o no de estrógenos. Primeramente valoramos la viabilidad celular mediante el ensayo MTT de hMSCs cultivadas en medio mínimo suplementado con distintas concentraciones de E2 (0,1-100 nM). Como se muestra en la Fig. 11A, no encontramos una variación significativa en la cantidad de células viables en el cultivo en respuesta a E2. Por tanto, nuestros resultados indican que los estrógenos no alteran la capacidad proliferativa de los cultivos de hMSCs en estas condiciones. Durante el desarrollo de esta tesis, otro trabajo ha descrito que el E2 estimula la proliferación de MSCs (Hong et al.). No obstante, en este caso el estímulo estrogénico se realizó en MSCs cultivadas con 10% de FBS. Por tanto, los datos sugieren que los estrógenos no dirigen una respuesta proliferativa en los cultivos de MSCs en ausencia de otros estímulos hormonales; sin embargo, el enriquecimiento del medio de cultivo con el cóctel de factores que aporta el FBS podría posibilitar un incremento en la proliferación de MSCs en respuesta a E2.

**A**



**B**



**Fig. 11. Proliferación de hMSCs en respuesta a 5-HT y E2.** Análisis mediante MTT de la proliferación de hMSCs mantenidas durante 72 horas en medio mínimo (DMEM-LG) suplementado con concentraciones crecientes de E2 (**A**) o con las combinaciones de 5-HT y E2 indicadas (**B**). Los resultados representan la media de tres experimentos independientes y como control positivo se muestra el cultivo con 10% FBS.

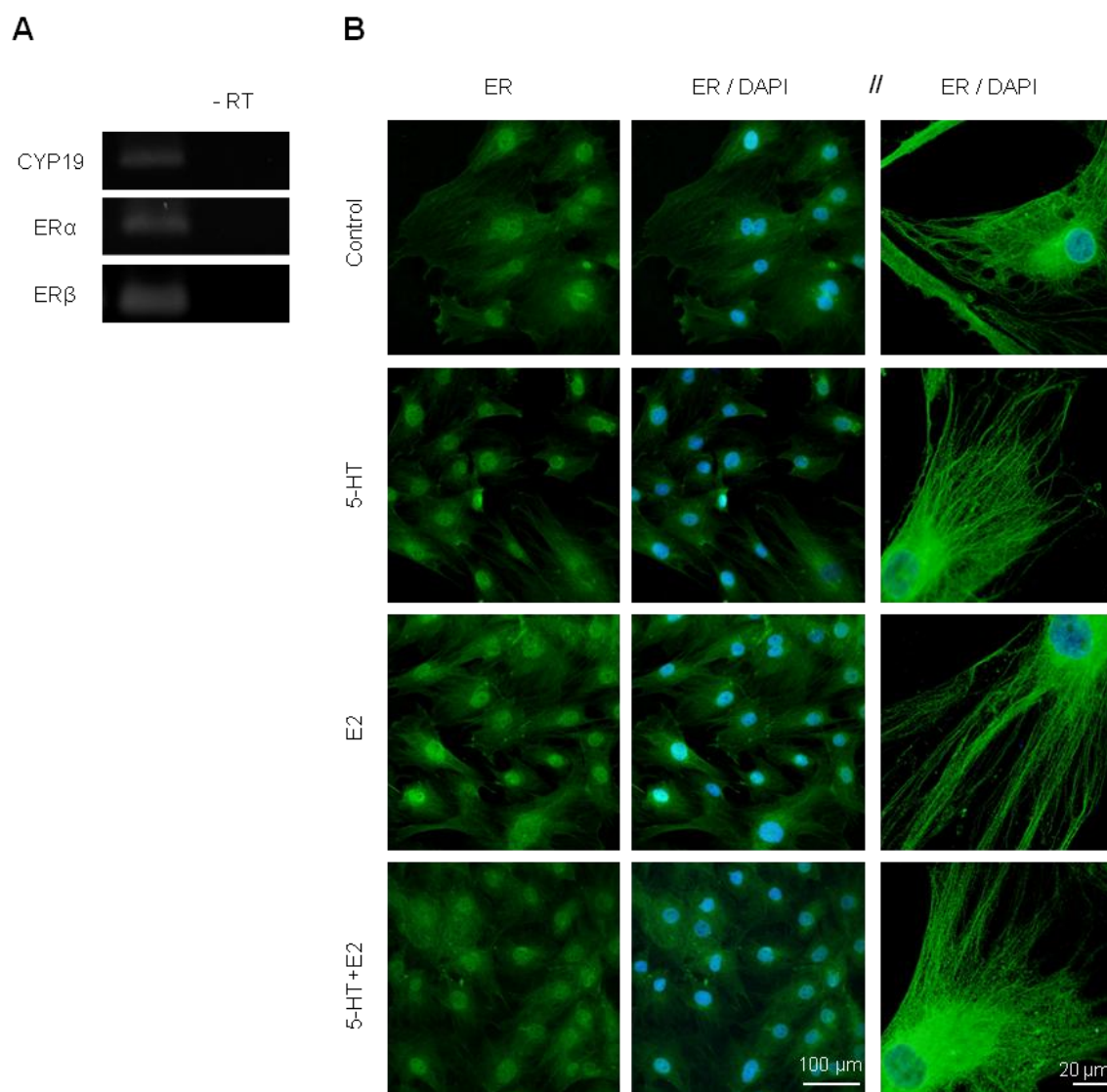
Existe una amplia literatura sobre la relación entre los sistemas serotoninérgico y estrogénico en las células del sistema nervioso central (Bertrand et al., 2005; Chavez et al.; McQueen et al., 1997; Pecins-Thompson et al., 1996; Smith et al., 2004; Sumner et al., 2007). En la mayoría de los casos, se ha reportado que los estrógenos promueven la acción de la 5-HT incrementando la expresión de múltiples mediadores de su señalización celular. Para estudiar el efecto de la acción combinada de ambas hormonas sobre la proliferación de las hMSCs, analizamos mediante ensayo MTT el efecto de la 5-HT (10 y 50  $\mu$ M) en condiciones de alta concentración de E2 (40 nM). Como se muestra en la Fig. 11B, el suplemento del cultivo con 5-HT en presencia de E2 condujo a un incremento significativo en la viabilidad celular dependiente de su concentración, incrementándose en dos veces la viabilidad de los cultivos suplementados con 5-HT 50  $\mu$ M más E2 40 nM. Estos resultados sugieren que ambos factores podrían iniciar procesos celulares en colaboración en las células progenitoras MSC de la médula ósea.

## 1.5 Las hMSCs expresan un sistema para sintetizar y responder a estrógenos

Como expusimos en la introducción, varios trabajos han indicado que las MSCs expresan el enzima aromatasa (CYP19), responsable de la síntesis de E2, y los receptores de estrógenos ER $\alpha$  y ER $\beta$ . Comprobamos la expresión de estos componentes del sistema estrogénico en nuestros cultivos de hMSCs. Para ello aislamos el ARN total de hMSCs mantenidas en condiciones de crecimiento y analizamos mediante RT-PCR la expresión de CYP19, ER $\alpha$  y ER $\beta$ . Como se observa en la Fig. 12A y en concordancia con lo publicado, las hMSCs expresan mensajeros para estos tres genes, lo que sugiere que estas células además de contar con receptores específicos para E2, pueden sintetizar estradiol a partir de precursores circulantes.

Estudiamos mediante inmunocitoquímica la localización celular de ER en las hMSCs en respuesta a E2 y/o 5-HT. Para ello, tras ayunar las células durante 24 horas, realizamos un estímulo de 1 hora con E2 40 nM. Igualmente, estimulamos las células con 5-HT 50  $\mu$ M o con una combinación de E2 y 5-HT. A continuación realizamos una inmunocitoquímica con un anticuerpo que reconoce la proteína ER total (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ). En la Fig. 12B podemos observar la expresión específica de ER en los cultivos de hMSCs en condiciones de crecimiento, pudiéndose diferenciar dos *pools* de ER, uno nuclear y uno citoplasmático. Curiosamente, parte de la fracción citoplasmática de ER parece estar asociada a microtúbulos, lo que se aprecia mejor en las imágenes tomadas con mayor aumento (60 $\times$ ). Esta asociación de ER a los microtúbulos se ha descrito en cultivos de células de carcinoma de mama MCF-7 (Azuma

et al., 2004; Manavathi et al., 2006), donde esta interacción parece regular la actividad transcripcional de ER. Por tanto, el citoesqueleto de tubulina de las hMSCs podría estar regulando la función de ER a través de una asociación directa o indirecta de éste a los microtúbulos de la célula. Además, no se aprecian diferencias en la distribución celular de ER en respuesta a E2 o 5-HT. Esto concuerda con otros trabajos que muestran que el E2, además de sus acciones genómicas mediadas por ER, puede ejercer acciones no genómicas en las hMSCs independientes de los receptores nucleares.



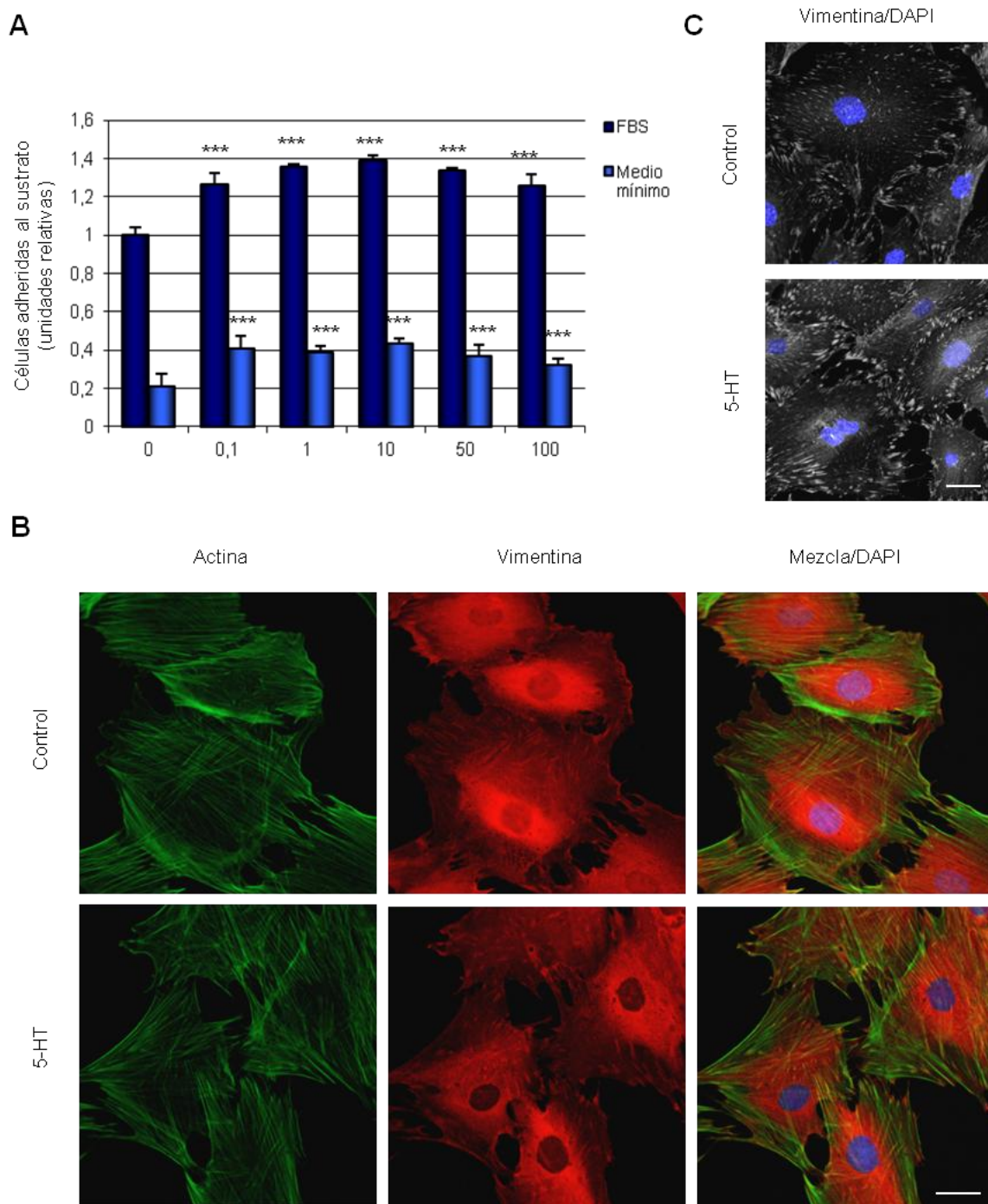
**Fig. 12. Las hMSCs expresan un sistema para sintetizar y responder a E2.** (A) Análisis mediante RT-PCR de la expresión de los genes del sistema de estrógenos que se indican en la imagen en hMSCs mantenidas en condiciones de crecimiento. (B) Análisis inmunocitoquímico de la proteína ER ( $\alpha$  y  $\beta$ ) en hMSCs cultivadas en medio mínimo y estimuladas durante 1 hora con las hormonas que se indican. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

## 1.6 La 5-HT estimula la adhesión de hMSCs

Sabemos que la 5-HT promueve la adhesión y migración de ciertos tipos celulares como mastocitos (Kushnir-Sukhov et al., 2006). Se ha sugerido que es la responsable de la movilización de HSCs y que promueve la migración de las células de la cresta neural craneal durante el desarrollo (Moiseiwitsch and Lauder, 1995). Por otra parte, se ha demostrado que la 5-HT está implicada en la expresión de distintas moléculas de adhesión y en los movimientos celulares que tienen lugar durante el desarrollo de *Drosophila* (Colas et al., 1999) (Schaerlinger B., 2007), actuando como un factor morfogenético durante la embriogénesis temprana.

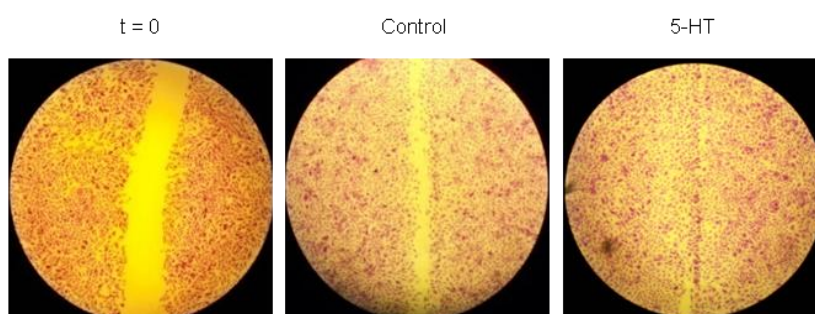
Para evaluar si la 5-HT actúa sobre la capacidad de adhesión de las hMSCs, valoramos la cantidad de células que se adhieren a un sustrato de fibronectina en presencia de distintas concentraciones de 5-HT. El ensayo se realizó en paralelo bajo dos condiciones experimentales consistentes en presencia o no de 10% de FBS en el medio de cultivo. Los resultados se muestran en la Fig. 13A. En ambas condiciones observamos un aumento en la adhesión celular dependiente de la concentración de 5-HT, alcanzándose un incremento del 40% en presencia de FBS y del 100% en su ausencia con una concentración de 5-HT 10  $\mu$ M. De estos resultados se desprende que la 5-HT puede cumplir un papel importante en la adhesión de las hMSCs, al menos en cultivo. Con estos datos, analizamos el comportamiento de las adhesiones focales de células ya adheridas al sustrato en respuesta a la adición de 5-HT. Para ello mantuvimos las hMSCs durante 24 horas en ausencia de FBS y a continuación realizamos un único estímulo de 10 minutos con 5-HT 50  $\mu$ M. Seguidamente, visualizamos las adhesiones focales mediante inmunocitoquímica doble contra actina y vinculina. Como se observa en la Fig. 13B, las hMSCs estimuladas con 5-HT presentan una mayor adhesión al sustrato, detectada por la acumulación de vinculina y la coincidencia de ésta con el extremo distal de los filamentos de actina (adhesiones focales). En la Fig. 13C puede observarse un detalle de esta acumulación de vimentina en las adhesiones focales en respuesta a 5-HT. Por tanto, los datos sugieren que la serotonina estimula la adhesión de las hMSCs al sustrato actuando sobre la formación y/o estabilidad de las adhesiones focales.





**Fig. 13. La 5-HT estimula la adhesión de hMSCs.** (A) Cuantificación de la adhesión celular a sustrato de fibronectina en respuesta a 5-HT. La misma cantidad de hMSCs se sembró en pocillos de cultivo tapizados con fibronectina que contenían cantidades crecientes de 5-HT en presencia o no de FBS. La adhesión se cuantificó tras 30 minutos de cultivo mediante tinción de las células adheridas con cristal violeta y cuantificación de la señal por espectrofotometría a 550 nm. Se muestra la media de tres experimentos independientes. (B) Inmunocitoquímica doble para actina y vimentina para visualizar las adhesiones focales. Las hMSCs se ayunaron 24 horas y seguidamente se estimularon con 5-HT 50  $\mu$ M durante 10 minutos. (C) Detalle de la inmunocitoquímica para vimentina de B. Los núcleos marcados con DAPI se muestran en azul. Barra de escala 20  $\mu$ m.

Ya que la adhesión celular al sustrato/matriz es un mecanismo fundamental para la migración celular, analizamos el efecto de la 5-HT sobre la migración de las hMSCs en cultivo. Para ello, y como una primera aproximación, valoramos mediante un ensayo de herida (ver *Materiales y Métodos*) la migración de estas células mantenidas en medio mínimo y en presencia/ausencia de 5-HT 50  $\mu$ M durante 24 horas. En la Fig. 14 se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes. Puesto que ya comprobamos que la serotonina no estimula la proliferación de las hMSCs, descartamos que este resultado se deba a una mayor proliferación celular en el cultivo suplementado con 5-HT. Por tanto, aunque éste es sólo un análisis preliminar, sugiere que la señalización de 5-HT puede alterar la capacidad migratoria de las hMSCs en estos cultivos y concuerda con nuestros resultados en los ensayos de adhesión en respuesta a serotonina.

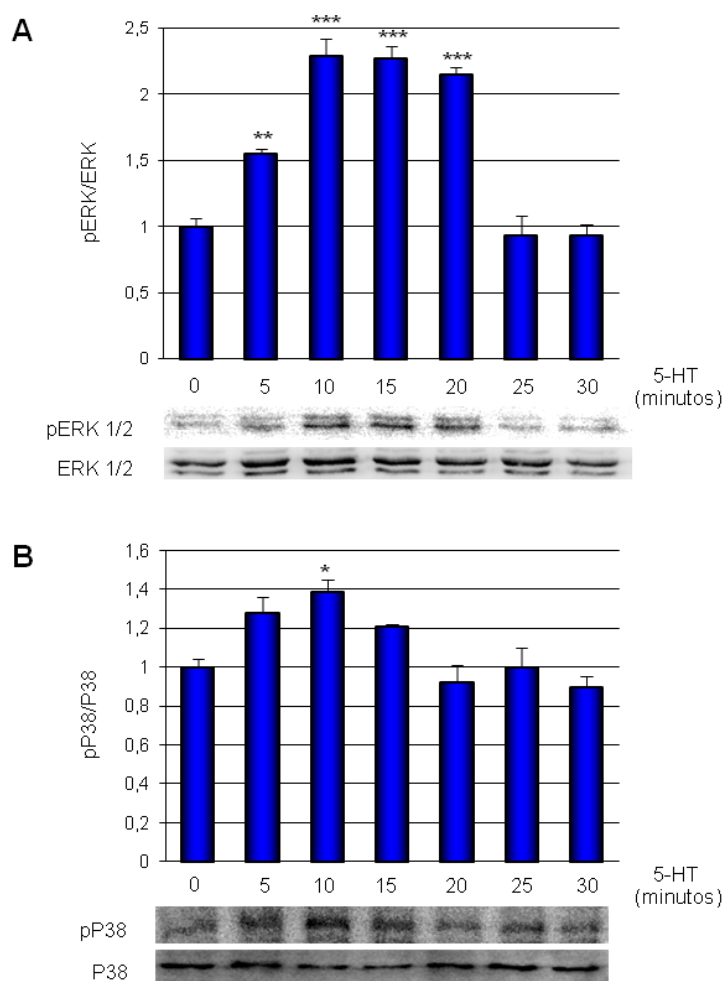


**Fig. 14. La 5-HT estimula la migración de hMSCs.** Ensayo de migración por herida en cultivos de hMSCs mantenidos durante 24 horas en DMEM-LG suplementado o no (control) con 5-HT 50  $\mu$ M. La herida inicial se muestra como t=0.

### 1.7 La 5-HT activa la MAPK ERK1/2 en hMSCs a través de sus receptores 5-HT2A y 5-HT2B

Una de las dianas celulares conocidas para la señalización de 5-HT, tanto por activación del receptor como mediante su entrada en el citoplasma a través de su transportador, es la vía de las MAPKs. Analizamos las cinéticas de fosforilación de las MAPKs ERK1/2 y P38 en las hMSCs en respuesta a 5-HT. Para ello cultivamos las células durante 24 horas en medio mínimo y seguidamente estimulamos con 5-HT 50  $\mu$ M durante los tiempos indicados (Fig. 15). A continuación, analizamos los extractos proteicos totales mediante Western-blot contra ERK1/2 y P38 fosforiladas. Como se observa en la Fig. 15A, la 5-HT estimuló significativamente la fosforilación de ERK1/2. El pico de activación se alcanzó tras 10 minutos de exposición a 5-HT, pasado este tiempo los niveles de ERK1/2 activada disminuyeron hasta alcanzar niveles próximos al control tras 25 minutos de estímulo. En el caso de P38 observamos una débil activación en respuesta a 5-HT, detectándose un incremento en su fosforilación a los 10 minutos del estímulo serotoninérgico (Fig. 15B). Por

tanto, estos datos indican que ERK1/2 es una diana de la señalización de 5-HT en los cultivos de hMSCs.

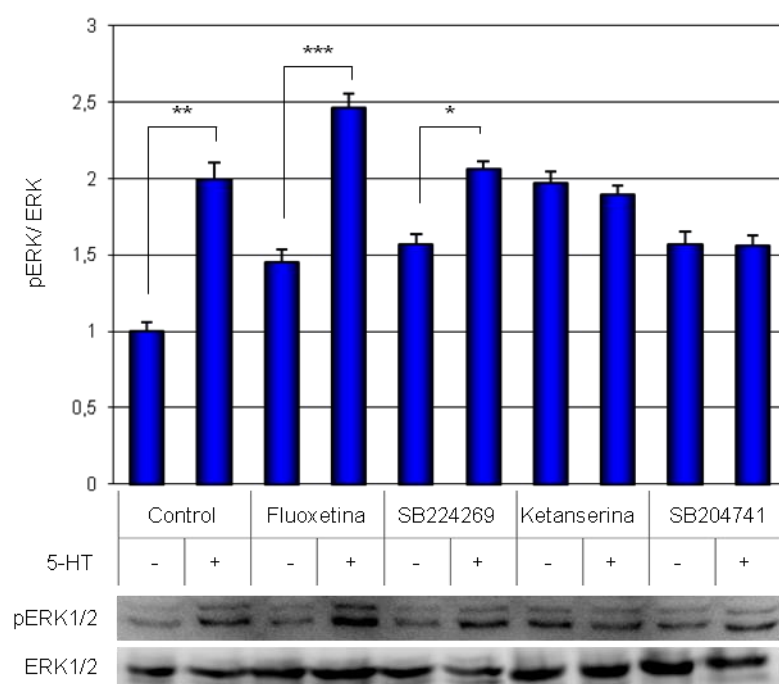


**Fig. 15. La 5-HT induce la fosforilación de ERK1/2 en hMSCs.** Análisis mediante Western-blot de la fosforilación de ERK1/2 (**A**) y P38 (**B**) inducida por 5-HT en hMSCs. Se analizaron extractos proteicos totales de hMSCs cultivadas en medio mínimo y estimuladas con 5-HT 50  $\mu$ M durante los tiempos indicados. Se muestra la media de tres experimentos independientes.

Con el objetivo de determinar la implicación de los distintos receptores serotoninérgicos y el transportador 5-HTT en esta fosforilación de ERK1/2 por 5-HT, realizamos otro ensayo similar utilizando distintos inhibidores específicos para 5-HT1B (SB224289, 1  $\mu$ M), 5-HT2A (ketanserina, 10  $\mu$ M), 5-HT2B (SB204741, 1  $\mu$ M) y 5-HTT (fluoxetina, 1  $\mu$ M), proteínas cuya expresión comprobamos en los cultivos de hMSCs. Para ello, tras incubar las células durante 30 minutos con cada uno de los inhibidores en medio mínimo, se realizó un estímulo de 15 minutos con 5-HT 50  $\mu$ M. Como se muestra en la Fig. 16, la inhibición tanto del receptor 5-HT2A como del 5-HT2B abolió el efecto de la 5-HT sobre la fosforilación de ERK1/2. La inhibición del receptor 5-HT1B condujo a una disminución en esta

respuesta de las hMSCs a 5-HT. Estos resultados indican un papel fundamental para los receptores 5-HT2A y 5-HT2B en la activación de ERK1/2 por 5-HT en estas células.

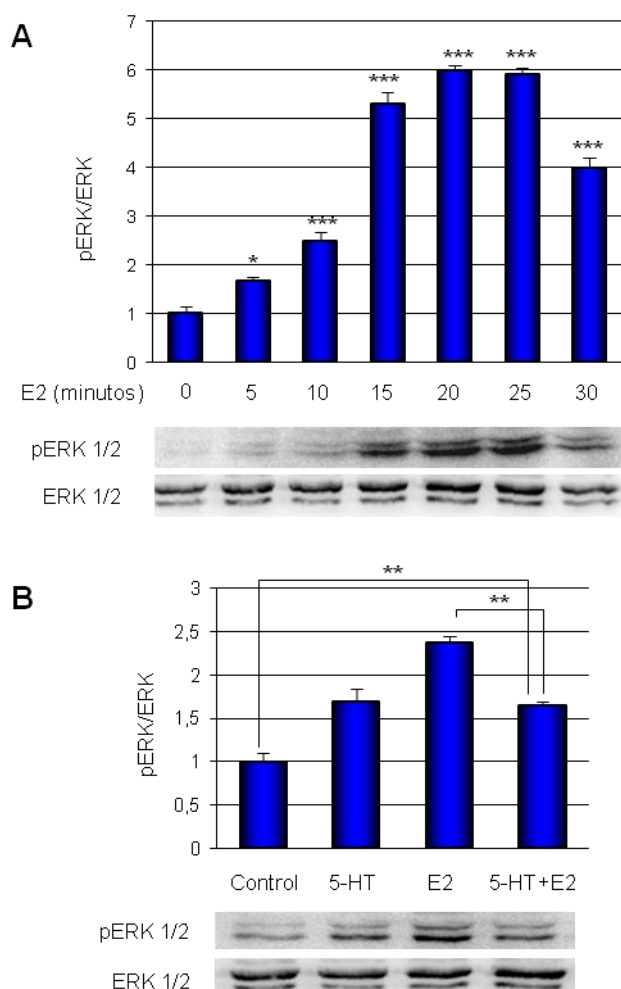




**Fig. 16. 5-HT2B y 5-HT2A median la fosforilación de ERK1/2 inducida por 5-HT.** Análisis mediante Western-blot de la fosforilación de ERK1/2 inducida por 5-HT en presencia de los inhibidores específicos SB224289 1  $\mu$ M (5-HT1B), ketanserina 10  $\mu$ M (5-HT2A), SB204741 1  $\mu$ M (5-HT2B) y fluoxetina 1  $\mu$ M (5-HTT). Se analizaron extractos proteicos totales de hMSCs estimuladas con 5-HT 50  $\mu$ M durante 15 minutos tras una incubación de 30 minutos cada inhibidor, o el vehículo (control) en medio mínimo. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

## 1.8 El E2 activa ERK1/2 en hMSCs. Relación con el estímulo serotoninérgico

Como ya hemos comentado, muchos de los efectos de los estrógenos han sido atribuidos a la regulación de cascadas de señalización citoplasmáticas independientes de sus receptores nucleares, entre ellas la vía de las MAPKs. La activación de ERK1/2 por E2 ha sido extensamente estudiada en varios tipos celulares, incluidas células de cáncer de mama (Castoria et al., 1999), endoteliales (Chen et al., 1999), de neuroblastoma (Watters et al., 1997) y osteoblásticas (Endoh et al., 1997; Jessop et al., 2001). Además, distintos trabajos sugieren que los efectos esqueléticos de los estrógenos son mediados a través de sus acciones no genómicas e implican la activación de ERK1/2 (Manolagas SC., 2002; Kousteni S., 2002; Almeida M., 2006). Puesto que nuestros datos parecen sugerir otras acciones para el E2 además de las mediadas por la actividad transcripcional de ER, estudiamos la cinética de fosforilación de ERK1/2 en respuesta a E2. Para ello, analizamos mediante Western-blot para p-ERK1/2 extractos proteicos totales de hMSCs estimuladas con E2 40 nM en medio mínimo durante los tiempos indicados (Fig. 17A). Como indica la gráfica, la acción de E2 condujo a una fuerte inducción de la fosforilación de ERK1/2, alcanzándose el pico de activación tras 20 minutos. Por tanto, nuestros resultados indican que la señalización de E2 en los cultivos de hMSCs conduce a la activación de ERK1/2, alcanzándose valores mayores y más prolongados que con el estímulo serotoninérgico.



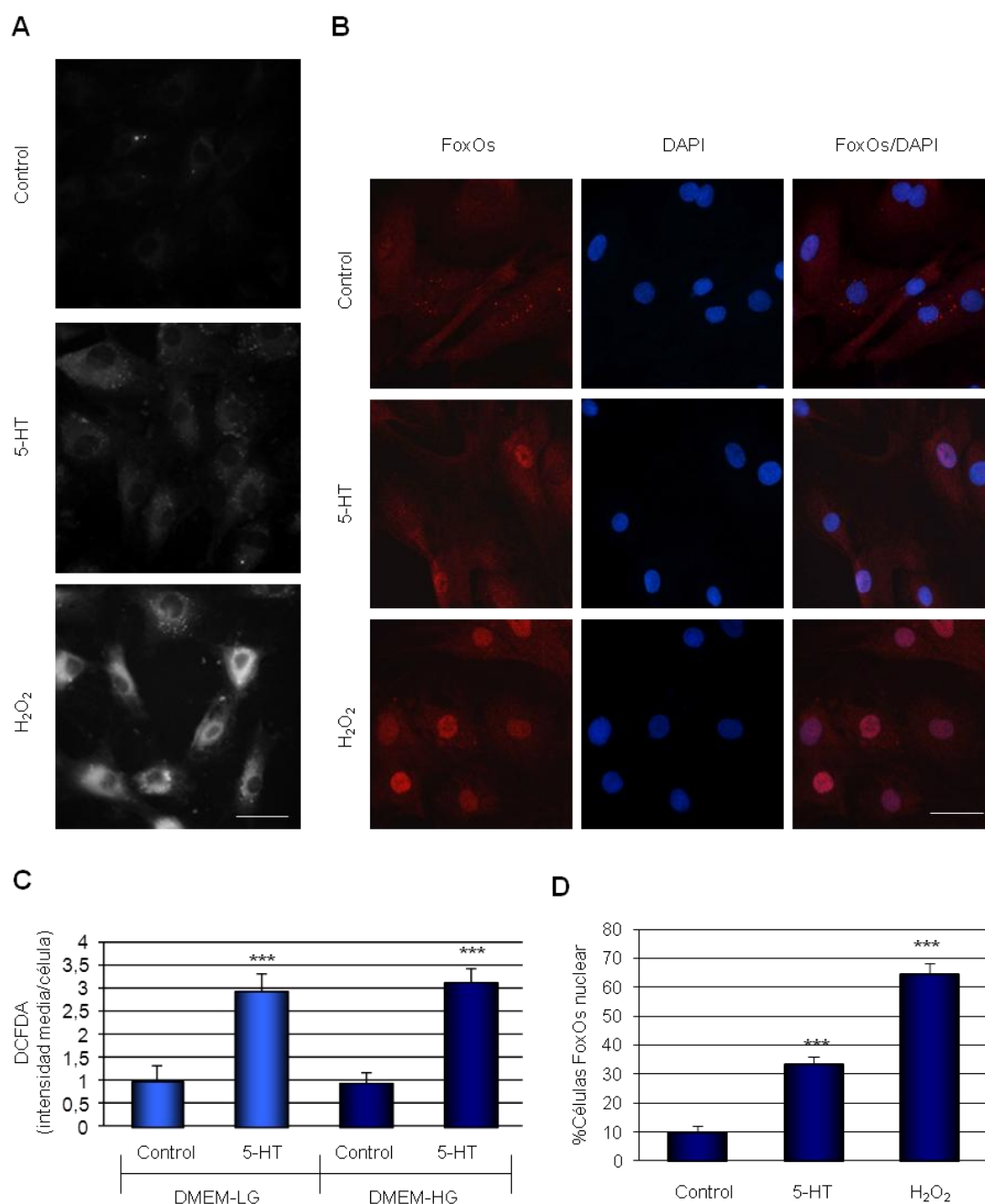
**Fig. 17. El E2 induce la fosforilación de ERK1/2 en hMSCs de manera dependiente de la presencia de 5-HT.** Análisis mediante Western-blot de la fosforilación de ERK1/2 inducida por E2. Se analizaron extractos proteicos totales de hMSCs estimuladas con E2 40 nM en medio mínimo durante los tiempos indicados (**A**), o con las combinaciones de 5-HT y E2 indicadas durante 10 minutos (**B**). En ambos casos, A y B, se muestra la media de tres experimentos independientes.

Con estos datos, y puesto que nuestros resultados indican una sinergia entre las acciones de 5-HT y E2 en la proliferación de las hMSCs, analizamos la activación de ERK1/2 en respuesta a la acción conjunta de ambas hormonas. Estimulamos las hMSCs durante 15' con 5-HT 50  $\mu$ M, E2 40 nM o ambas. Así, constatamos que el estímulo con E2 conduce a una activación de ERK1/2 superior a la inducida por 5-HT (Fig. 17B). Además, cuando el estímulo se realizó con las dos hormonas conjuntamente, el nivel de fosforilación alcanzado fue el mismo que cuando se estimuló sólo con 5-HT. Por tanto, los datos indican que las vías de señalización activadas tanto por 5-HT como por E2 en las hMSCs conducen a la activación de ERK1/2 y que no existe una sinergia entre estas acciones. En su lugar, la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a E2 es abolida por la presencia de 5-HT en el cultivo. Este dato sugiere una relación entre los sistemas de señalización activados por la 5-HT y el E2 en las hMSCs.

### 1.9 La 5-HT induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de factores FoxO en las hMSCs

Como mencionamos en la introducción, uno de los mecanismos de señalización de las aminas biógenas implica la captación de éstas hacia el interior celular a través de su

transportador específico y su subsiguiente degradación por la acción de oxidasas de aminas (MAO y SSAO).



**Fig. 23. La 5-HT induce la generación de ROS y la activación de factores FoxO en las hMSCs.** (A) Análisis mediante DCFDA de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en respuesta a 5-HT. Se cultivaron hMSCs en DMEM-LG (baja glucosa) y DMEM-HG (alta glucosa) y se estimularon durante 1 hora con 5-HT 50  $\mu$ M. Se muestran imágenes representativas del ensayo en condiciones de baja glucosa (similares a las obtenidas con alta glucosa). (C) Cuantificación de la señal DCF como medida del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado en las distintas condiciones experimentales expuestas en A. (B) Inmunocitoquímica para factores FoxO en hMSCs cultivadas en medio mínimo (control) y estimuladas 1 hora con 5-HT 50  $\mu$ M y cuantificación de los núcleos positivos para FoxO en un total de 500 células (D). Los núcleos aparecen marcados con DAPI. En ambos casos se utilizó como control positivo un estímulo de 10 minutos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100  $\mu$ M. Barra de escala 50  $\mu$ M.

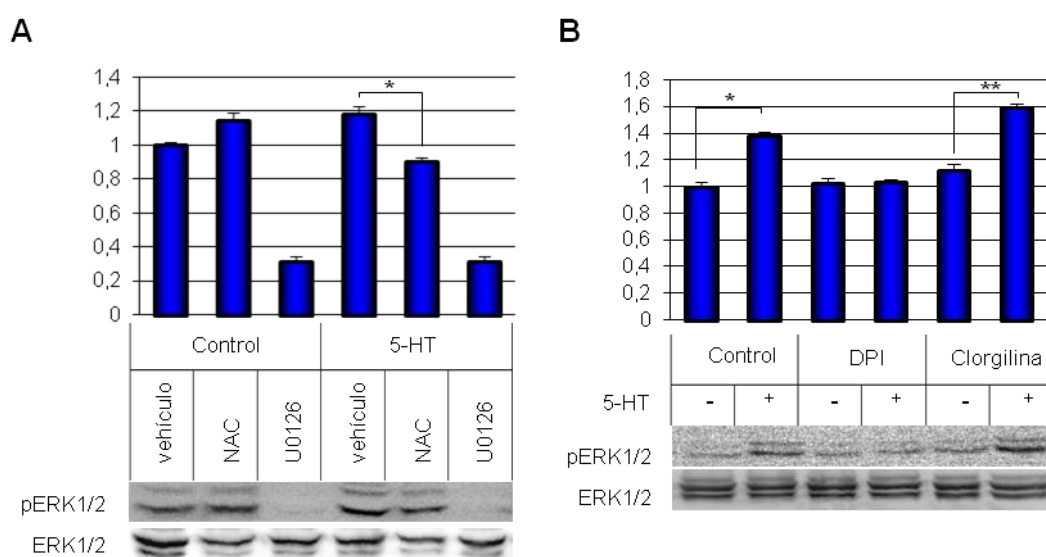
Los productos generados durante esta oxidación incluyen el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), una ROS que actúa como segundo mensajero regulando distintas rutas de transducción de señales en diversas funciones celulares como proliferación, diferenciación, migración y apoptosis (Nishio and Watanabe, 1997; Sauer et al., 2000; Sundaresan et al., 1995; Thannickal and Fanburg, 2000). Este mecanismo de señalización de la 5-HT ha sido descrito en distintos tipos celulares, como células de músculo liso (Lawrie et al., 2005) y cardiomiocitos (Bianchi et al., 2005a; Bianchi et al., 2005b; Foussal C y col., 2010) y también en MSCs (Trousche et al.). Curiosamente, se ha descrito que el receptor 5-HT<sub>2B</sub> está acoplado a la producción de  $H_2O_2$  a través de la activación de NADPH oxidasa tanto en cardiomiocitos (Lawrie et al., 2005; Lee et al., 1998; Liu et al., 2004) como en células neuronales (MacFarlane et al.; Pietri et al., 2005; Schneider et al., 2006). Para valorar el posible efecto de la 5-HT sobre la producción de  $H_2O_2$  en hMSCs, se cultivaron éstas en condiciones de baja (DMEM-LG) y alta glucosa (DMEM-HG) y se expusieron durante una hora a 5-HT 50  $\mu$ M. La cantidad de  $H_2O_2$  generado en cada condición se valoró mediante marcaje con DCFDA (ver *Material y Métodos*), utilizándose como control positivo la exposición a  $H_2O_2$  100  $\mu$ M durante 10 minutos. Como se muestra en la Figs. 23A y 23C, en ambas condiciones de cultivo el estímulo serotoninérgico condujo a un notable incremento en la generación de ROS. Estos resultados sugieren que la 5-HT puede estimular la generación de ROS en los cultivos de hMSCs.

Como mediadores fundamentales de la señalización ROS, estudiamos la respuesta de los factores de transcripción FoxO al estímulo con 5-HT. Estimulamos cultivos de hMSCs con 5-HT 50  $\mu$ M tras 24 horas de privación de FBS. Después de una hora de estímulo, realizamos una inmunocitoquímica con un anticuerpo que reconoce a los miembros FoxO1, FoxO3 y FoxO4 de la familia FoxO. Como control positivo utilizamos el estímulo con  $H_2O_2$  100  $\mu$ M durante 10 minutos. Los resultados obtenidos (Figs. 23B y 23D) muestran una acumulación de factores FoxO en los núcleos de las hMSCs estimuladas con 5-HT, lo que sugiere que la señalización de 5-HT conduce a la activación de los factores FoxO en estas células, probablemente a través del estímulo de la señalización ROS observado.

### 1.10 La activación de ERK1/2 en respuesta a serotonina es dependiente del estatus oxidativo celular y de la actividad NADP(H) oxidasa en hMSCs

Los mejores ejemplos de la implicación de ROS en la activación de ERK1/2 han sido proporcionados por receptores de factores de crecimiento ligados a tirosín quinasas, como los receptores de IL-1 (interleukina-1), PDGF (*platelet-derived growth factor*) y EGF (*epidermal*

*growth factor*). Sin embargo, el papel de receptores acoplados a proteínas G ha sido menos explorado. Puesto que nuestros resultados indican que la 5-HT induce tanto la generación de ROS como la activación de ERK1/2 en hMSCs, estudiamos si esta fosforilación de ERK1/2 es dependiente del estatus oxidativo celular. Para ello expusimos las células a 5-HT 50  $\mu$ M durante 15 minutos, tras un pretratamiento de 30 minutos con el antioxidante NAC 20 mM o con el inhibidor específico de la fosforilación de ERK1/2 U0126 10  $\mu$ M como control. A continuación, analizamos los extractos proteicos totales de estos cultivos mediante *Western-blot* contra pERK1/2. En la Fig. 24A podemos observar que la presencia de NAC en el cultivo abolió el efecto de la 5-HT sobre la fosforilación de ERK1/2. Por tanto, los resultados sugieren que la activación de ERK1/2 en respuesta a 5-HT depende la concentración de ROS en las hMSCs.



**Fig. 24. La fosforilación de ERK1/2 por 5-HT en hMSCs es dependiente de la generación de ROS por actividad NAD(P)H oxidasa. (A)** Western blot para pERK1/2 de hMSCs cultivadas en las condiciones indicadas. Se preincubaron las células con el antioxidante NAC 20 mM, con U0126 10  $\mu$ M o con el vehículo (DMSO, control) durante 30 minutos y seguidamente se estimularon con 5-HT 50  $\mu$ M, E2 40 nM, una combinación de ambas o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100  $\mu$ M durante 15 minutos. **(B)** Cuantificación de la señal de banda de los geles anteriores por densitometría.

Puesto que, como ya hemos indicado, distintos trabajos indican que la 5-HT puede inducir la activación de ERK1/2 activando las enzimas productoras de ROS MAO-A y NAD(P)H oxidasa, estudiamos la implicación de estas proteínas en la acción de la 5-HT sobre ERK1/2. Para ello tratamos cultivos de hMSCs durante 30 minutos con los inhibidores específicos clorgilina (100  $\mu$ M) para MAO-A y DPI (1  $\mu$ M) para NAD(P)H oxidasa. A continuación estimulamos las células con 5-HT 50  $\mu$ M durante 15 minutos y analizamos la cantidad total de proteína ERK1/2 fosforilada mediante *Western-blot*. En la Fig. 24B puede apreciarse que la

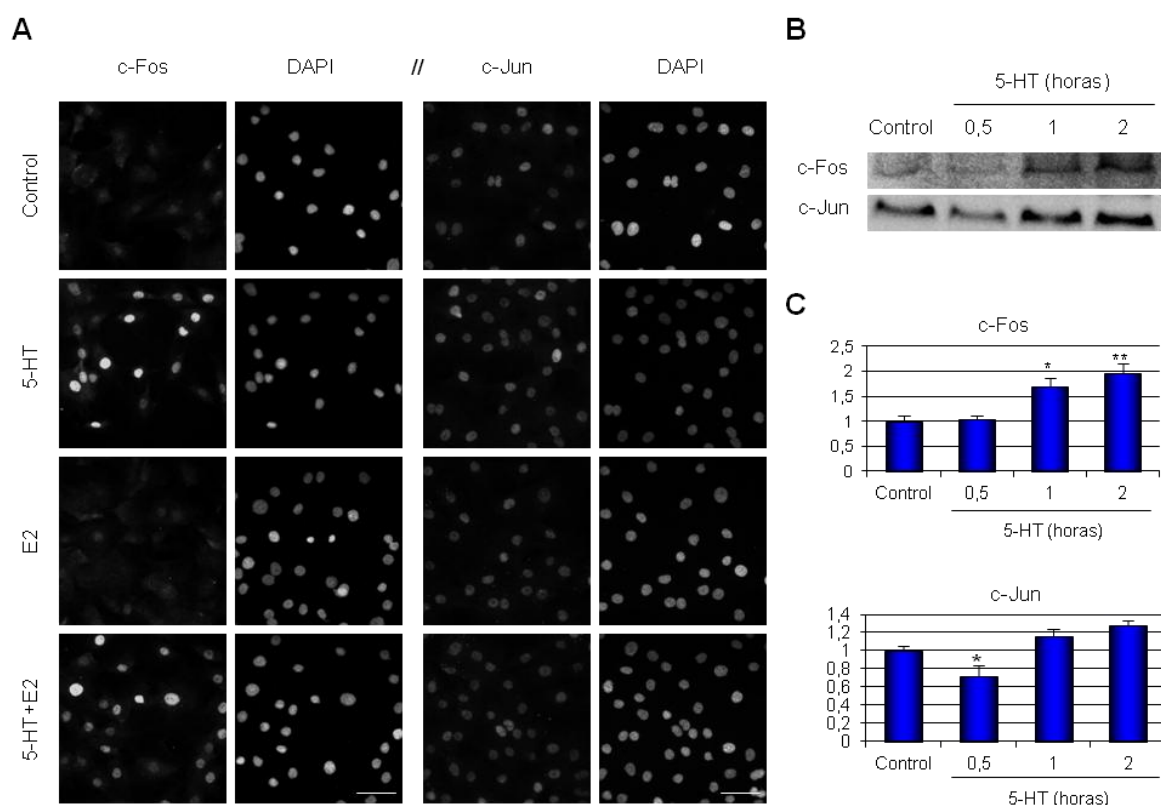
inhibición de la actividad NAD(P)H oxidasa con DPI abolió la fosforilación de ERK1/2 inducida por 5-HT. Sin embargo, el tratamiento con clorgilina no afectó a esta acción de la serotonina.

Aunque nuevos experimentos son necesarios, estos resultados indican que la señalización serotoninérgica en hMSCs, como en otros tipos celulares, puede conducir a la fosforilación de ERK1/2 estimulando la generación de ROS a través de la activación de NAD(P)H oxidasa.

### 1.11 La 5-HT induce la translocación nuclear de c-Fos en hMSCs mediante la activación de 5-HT<sub>2A</sub>, NAD(P)H oxidasa y ERK1/2

c-Fos es un factor de transcripción fundamental en el tejido óseo, lo que se aprecia claramente en su patrón de expresión durante el desarrollo esquelético (Sandberg et al., 1988). El fenotipo de distintos ratones transgénicos indica efectos específicos de esta proteína en el esqueleto. Mientras que la expresión ectópica de c-Fos desde un promotor ubicuo no tiene efectos notables en la diferenciación celular de la mayoría de órganos, resulta en la transformación específica de los osteoblastos, conduciendo al desarrollo de sarcomas osteogénicos similares a los osteosarcomas humanos (Grigoriadis et al., 1993). Por otra parte, los ratones deficientes en c-Fos desarrollan una osteopetrosis severa atribuida a la carencia de osteoclastos (Grigoriadis et al., 1994; Iotsova et al., 1997).

En vista de que la acción de la 5-HT conduce a la activación de ERK1/2 en hMSCs, determinamos la acción de la 5-HT sobre la activación de c-Fos (diana de ERK1/2) en estas células. Para ello expusimos las células en cultivo, tras 24 horas de privación de FBS, a un único estímulo de 1 hora con 5-HT 50  $\mu$ M. Puesto que nuestros resultados indican que ERK1/2 es también fosforilada por E2, así como que la señalización de 5-HT interfiere en esta acción, analizamos también la respuesta a los estímulos con E2 40 nM y con la combinación de 5-HT y E2. Determinamos la localización celular de c-Fos y analizamos paralelamente la distribución de c-Jun (diana de la MAPK JNK) en hMSCs mediante inmunocitoquímica. Como se muestra en la Fig. 18A, el estímulo con 5-HT estimuló la acumulación nuclear de c-Fos en hMSCs, y esta activación de c-Fos no se vio alterada por la presencia de E2 en el cultivo. El estímulo con E2, por el contrario, no modificó la distribución celular de esta proteína. Por otra parte, no se observan cambios aparentes en la localización subcelular de c-Jun en respuesta a ninguno de los estímulos, siendo predominantemente nuclear en todas las condiciones analizadas.



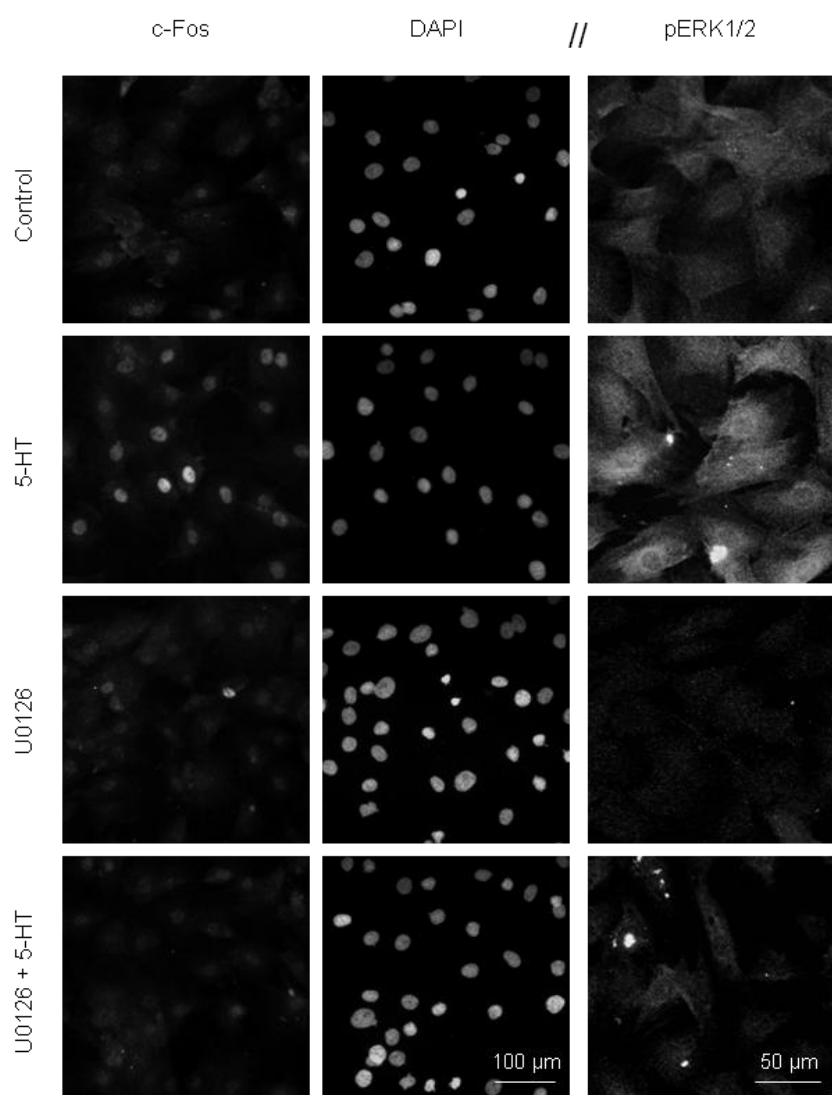
**Fig. 18. La 5-HT induce la acumulación nuclear de c-Fos en hMSCs.** (A) Análisis inmucitoquímico de c-Fos y c-Jun. Las hMSCs fueron ayunadas durante 24 horas y seguidamente estimuladas con las hormonas indicadas durante 1 hora. Las concentraciones utilizadas fueron 5-HT 50  $\mu$ M y E2 40 nM. Los núcleos aparecen marcados con DAPI. (B) Western-blot para c-Fos y c-Jun de extractos nucleares de hMSCs estimuladas o no (control) con 5-HT 50  $\mu$ M durante los tiempos indicados. (C) Cuantificación de la señal de banda de los geles anteriores por densitometría. Barra de escala 100  $\mu$ m.

Con el fin de confirmar la activación de c-Fos por 5-HT analizamos mediante Western-blot contra c-Fos y c-Jun extractos proteicos nucleares de hMSCs expuestas a 5-HT 50 $\mu$ M durante 0,5, 1 y 2 horas, tras mantenerlas durante 24 horas sin FBS. En las Figs. 18B y 18C se comprueba que la 5-HT estimula la acumulación nuclear de la proteína c-Fos, y no de c-Jun, tras una hora de estímulo. Por consiguiente, estos resultados indican que el estímulo serotoninérgico conduce a una activación de la proteína c-Fos en los cultivos de hMSCs independientemente de la concentración de E2 en el medio.

En vista de los resultados comprobamos si la acumulación nuclear de c-Fos observada era consecuencia de la activación de ERK1/2 en respuesta a 5-HT. Para ello realizamos un ensayo igual al de la Fig. 18A en el que pretratamos las células durante 30 minutos con el inhibidor específico de MEK1/2 (MAPKK responsable de la fosforilación de ERK1/2) U0126 (10  $\mu$ M). En la Fig. 19 puede apreciarse que la activación de c-Fos por 5-HT es efectivamente dependiente de la previa activación de ERK1/2. En la misma figura podemos observar una inmunocitoquímica paralela para pERK1/2 de estos mismos cultivos,



como control de la inhibición de la fosforilación de ERK1/2 por 5-HT en presencia de U0126. Por tanto, los resultados sugieren una activación de la señalización ERK1/2 → c-Fos por 5-HT en los cultivos de hMSCs.



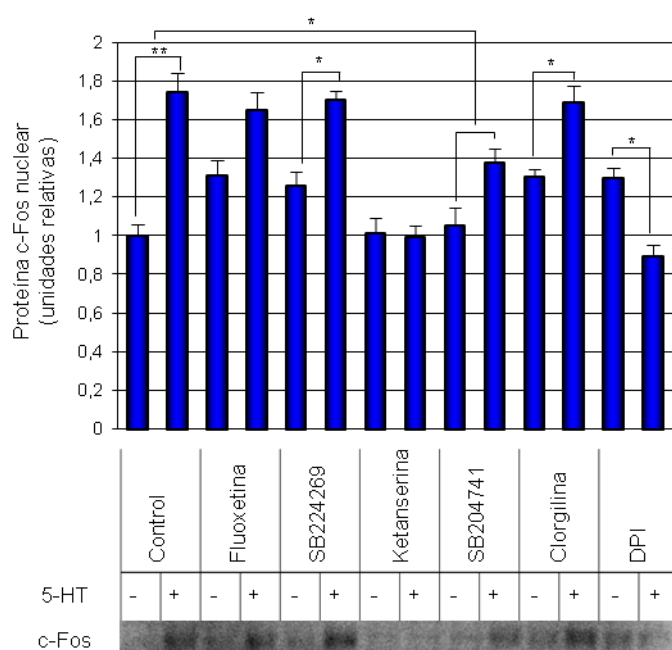
**Fig. 19. La activación de c-Fos por 5-HT es dependiente de la previa fosforilación de ERK1/2.**

Análisis inmucitoquímico de c-Fos y pERK1/2 en hMSCs. Las células fueron ayunadas durante 24 horas, incubadas durante 30 minutos con U0126 10  $\mu$ M o el vehículo (DMSO, control), y seguidamente estimuladas con 5-HT 50  $\mu$ M durante 1 hora. Los núcleos aparecen marcados con DAPI. Las imágenes son representativas de tres experimentos

Determinamos qué componentes del sistema serotoninérgico median la translocación nuclear de c-Fos dependiente de ERK1/2 en respuesta a 5-HT. Analizamos también la posible implicación de la generación de ROS por acción de la 5-HT que detectamos previamente. Con este propósito, pretratamos hMSCs mantenidas 24 horas en medio mínimo con inhibidores específicos para 5-HT<sub>1B</sub> (SB224289, 1  $\mu$ M), 5-HT<sub>2A</sub> (ketanserina, 10  $\mu$ M), 5-HT<sub>2B</sub> (SB204741, 1  $\mu$ M), 5-HTT (fluoxetina, 1  $\mu$ M), MAO-A (clorgilina, 100  $\mu$ M) y NAD(P)H oxidasa (DPI, 1  $\mu$ M) durante 30 minutos. Seguidamente estimulamos las células durante una hora con 5-HT 50  $\mu$ M y analizamos mediante Western-blot la presencia de c-Fos en los extractos proteicos nucleares de estos cultivos. Como se observa en la Fig. 20, tanto la inhibición del receptor 5-HT<sub>2A</sub> como del enzima NAD(P)H oxidasa abolieron la acción de la 5-



HT sobre la proteína c-Fos. Además, se aprecia una disminución significativa en este estímulo serotoninérgico en presencia del inhibidor de 5-HT<sub>2B</sub>. Por tanto, estos resultados sugieren que la activación de c-Fos en respuesta a 5-HT en hMSCs es dependiente de las actividades de su receptor 5-HT<sub>2A</sub> y del enzima NAD(P)H oxidasa. Asimismo, y en concordancia con nuestro análisis de la activación de ERK1/2, los datos indican que la activación del receptor 5-HT<sub>2B</sub> por 5-HT puede estimular también la acumulación nuclear de c-Fos. Aunque nuevos experimentos son necesarios, los datos concuerdan con una señalización NAD(P)H oxidasa→ROS→ERK1/2→c-Fos activada por 5-HT a través de su acción sobre los receptores 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2B</sub>, siendo la actividad de 5-HT<sub>2A</sub> necesaria para esta respuesta de las hMSCs a 5-HT. La importancia de esta activación de NAD(P)H oxidasa por 5-HT a través de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> ya ha sido descrita en otras funciones de la serotonina, como el estímulo de la actividad neuronal (Peng YJ., 2006; MacFarlane PM., 2001), la proliferación de células mesangiales (Grewal JS., 1999; Greene EL., 2000) y la hipertrofia de cardiomiocitos (Monassier L., 2008).

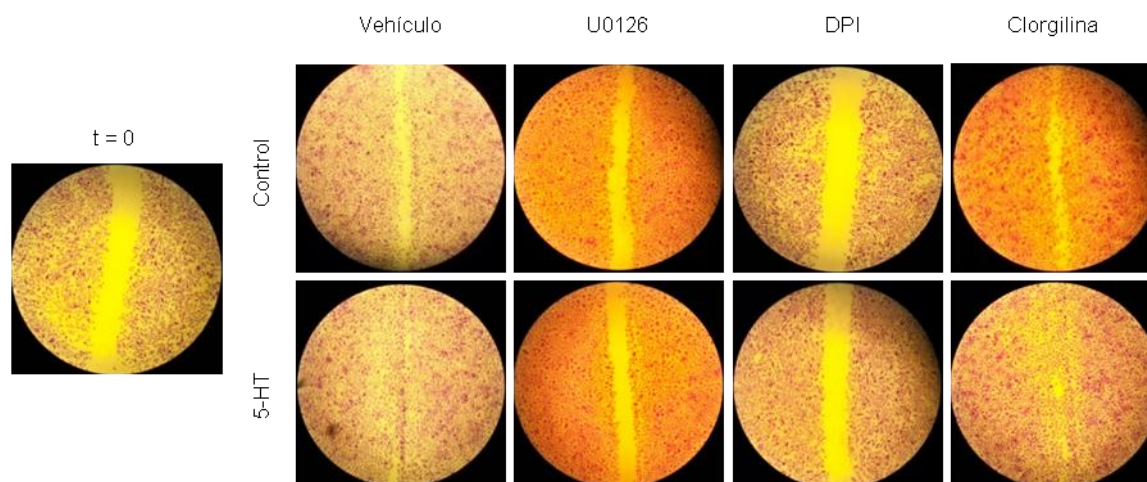


**Fig. 20. La acumulación nuclear de c-Fos inducida por 5-HT depende de las actividades de 5-HT<sub>2A</sub> y NA(P)H oxidasa.** Western-blot para c-Fos de extractos nucleares de hMSCs estimuladas o no (control) con 5-HT 50  $\mu$ M durante 1 hora en presencia de los inhibidores indicados. La gráfica representa la señal de banda de los geles obtenida por densitometría y es representativa de tres experimentos independientes.

### 1.12 La migración de hMSCs es dependiente de las actividades de NADPH oxidasa y ERK1/2

Recientemente se ha descrito que la generación intracelular de ROS y la consecuente activación de rutas de señalización específicas es un evento crítico para la migración de las MSCs (Novo et al.). Ya que nuestros resultados indican que la 5-HT es capaz tanto de

promover la migración de hMSCs como de estimular la señalización ROS en estas células, estudiamos la implicación de ROS en la migración de hMSCs en respuesta a 5-HT.



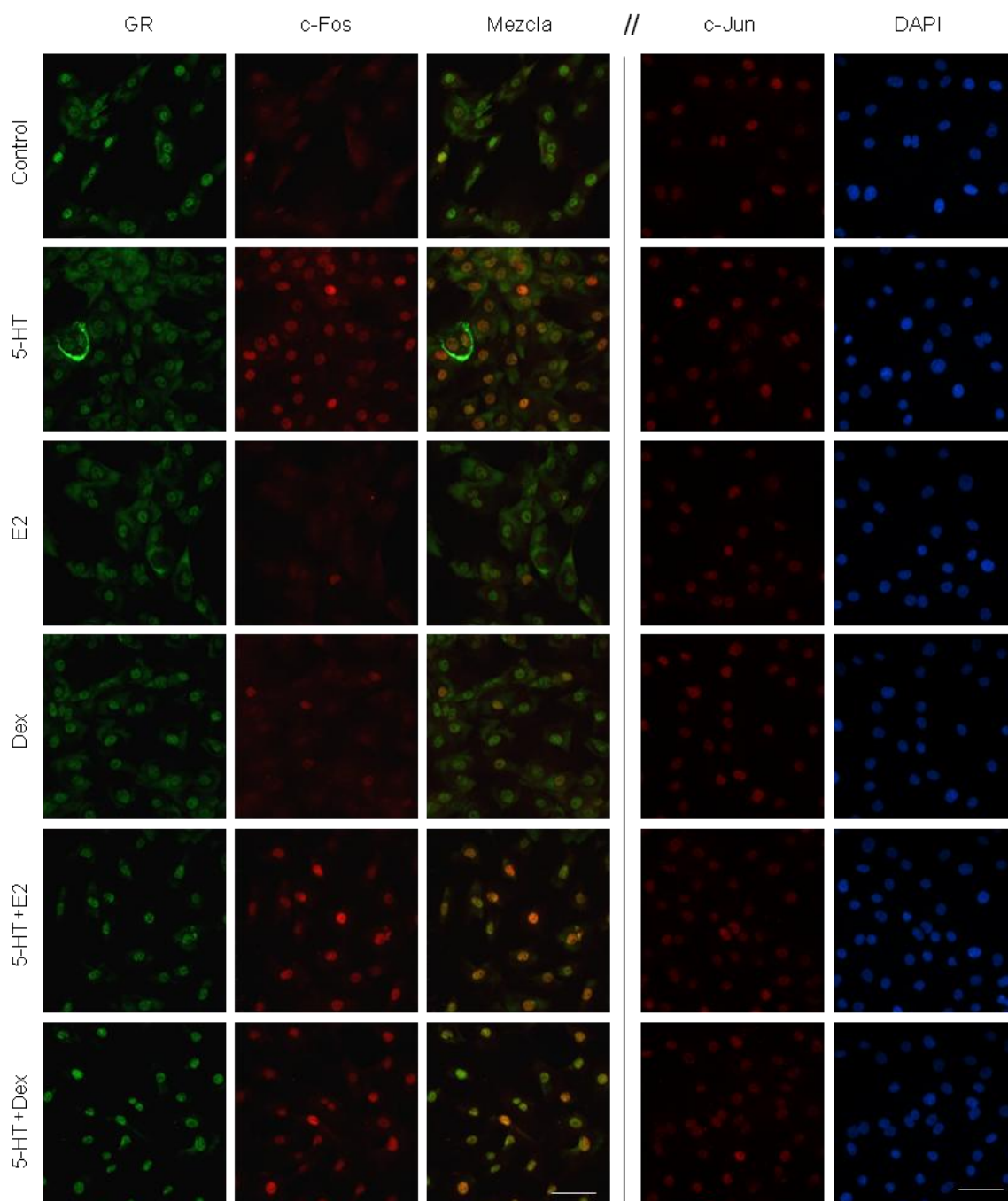
**Fig. 25. La migración de hMSCs es dependiente de las actividades de ERK1/2 y de NADPH oxidasa.** Migración de hMSCs en presencia de los inhibidores de ERK1/2 (U0126 10  $\mu$ M), MAO-A (clorgilina 100  $\mu$ M), NADPH oxidasa (DPI 1  $\mu$ M), o el vehículo (DMSO, control). Se realizó un ensayo de herida y se valoró la migración alcanzada por las hMSCs tras 24 horas en DMEM-LG suplementado con cada uno de los inhibidores y en presencia o no de 5-HT 50  $\mu$ M. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

Para ello realizamos un ensayo de herida (ver *Materiales y Métodos*) en el que valoramos la cantidad de células migradas tras 24 horas al inhibir la actividad de las enzimas generadoras de ROS MAO-A y NAD(P)H oxidasa. Nuevamente, utilizamos los inhibidores específicos clorgilina (100  $\mu$ M) para MAO-A y DPI (1  $\mu$ M) para NAD(P)H oxidasa. Como se observa en la Fig. 25, la inhibición de la actividad NADPH oxidasa resultó en una ausencia total de células migradas hacia la herida. Sin embargo, la migración celular en presencia del inhibidor de MAO-A fue similar al control, lo que parece indicar que la generación de ROS por actividad NADPH oxidasa, y no mediante MAO-A, es un mecanismo fundamental para la migración de hMSCs. En vista de que nuestros resultados indican un papel para la señalización ROS en la activación de ERK1/2 en estas células, valoramos asimismo la posible implicación de esta quinasa en la migración de hMSCs, para lo que utilizamos el inhibidor U0126 (10  $\mu$ M). Como puede apreciarse en la Fig. 25, la migración de hMSCs se ve claramente reducida en presencia de U0126, lo que indica una participación de ERK1/2 en este proceso. Realizamos los mismos ensayos de herida incubando las células con cada uno de los inhibidores junto con 5-HT 50  $\mu$ M. Como se muestra en la Fig. 25, el estímulo de la migración de hMSCs por 5-HT no se ve alterado por la acción de la clorgilina. Por el contrario, en los cultivos en los que inhibimos NADPH oxidasa o ERK1/2, la 5-HT no altera la migración celular. En concordancia con los resultados anteriores, estos datos sugieren que la/s ruta/s de señalización activadas

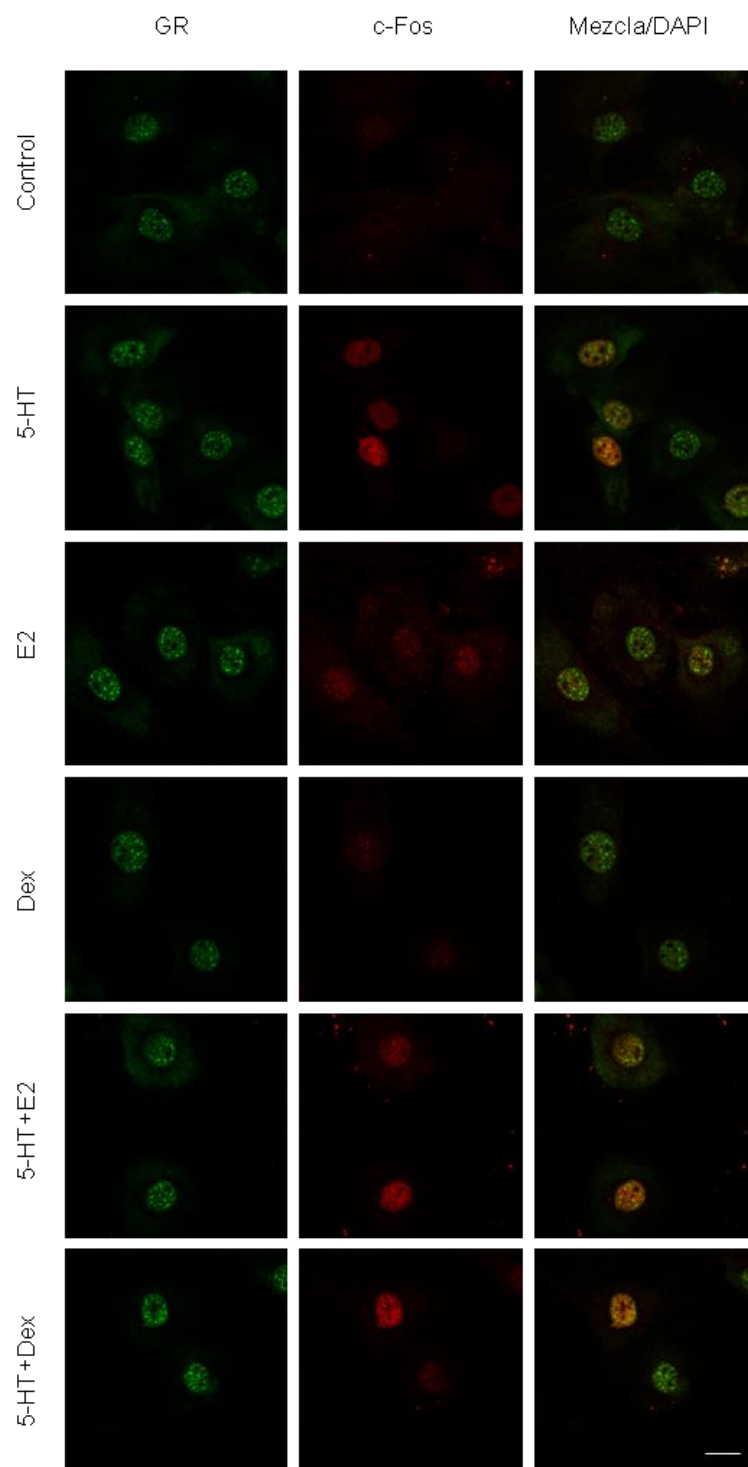
por 5-HT en las hMSCs implican tanto a NADPH oxidasa como a ERK1/2, y son independientes de la actividad de MAO-A.

### **1.13 Receptor de glucocorticoides (GR) y c-Fos en respuesta a 5-HT**

Es ampliamente conocido que a bajas concentraciones los glucocorticoides estimulan la diferenciación osteoblástica de las MSCs, mientras que altas concentraciones incrementan la adipogénesis en estas células. De hecho, el cóctel de diferenciación adipogénica (AIM) comúnmente usado en los protocolos de diferenciación de MSCs contiene una concentración de dexametasona mil veces superior a la del medio de inducción osteogénico (OIM) (Pittenger 1999). Esto nos llevó a estudiar la posible relación de la señalización de glucocorticoides con la acción de la 5-HT en las MSCs, para lo que analizamos la distribución subcelular de GR en las hMSCs y su posible respuesta al estímulo serotoninérgico. Igualmente, analizamos la respuesta de GR y c-Fos a los estímulos con estrógenos y con glucocorticoides. Con este fin, cultivamos hMSCs en medio mínimo durante 24 horas y seguidamente suplementamos el medio durante una hora con 5-HT (50  $\mu$ M), E2 (40nM), Dexametasona (Dex, 100nM), 5-HT más E2 o 5-HT más Dex. A continuación, realizamos una inmunocitoquímica doble contra GR y c-Fos. Como observamos en la Fig. 21, el receptor de glucocorticoides muestra una localización predominantemente nuclear en todas las condiciones analizadas. Se aprecia también que el estímulo con 5-HT conduce a la acumulación nuclear de c-Fos y que esta acción no se ve alterada ni por la presencia de E2 (como ya habíamos observado) ni por la de dexametasona. En la misma figura se muestra también una inmunocitoquímica de los mismos cultivos para c-Jun, donde volvemos a observar la situación predominantemente nuclear de esta proteína en todas las condiciones analizadas, también con el estímulo con glucocorticoides (Dex). Por tanto, estos resultados indican que las hMSCs mantenidas en ausencia de FBS muestran las proteínas GR y c-Jun activadas en el núcleo, mientras que la proteína c-Fos apenas es detectable. La acción de la 5-HT, sin embargo, conduce a una notable activación de c-Fos sin alterar de manera evidente ni GR ni c-Jun. Como una primera aproximación para estudiar una posible modulación de los complejos GR/AP-1 por la activación de c-Fos por 5-HT, analizamos estas muestras con microscopía confocal. Como se muestra en la Fig. 22, las imágenes obtenidas son compatibles con una situación en la que la acción de la 5-HT puede alterar la respuesta de las hMSCs a los glucocorticoides.



**Fig. 26. La proteína c-Fos activada por 5-HT podría interactuar con GR en el núcleo de las hMSCs.** Inmunocitoquímica doble para GR y c-Fos e inmunocitoquímica para c-Jun. Las hMSCs fueron ayunadas durante 24 horas y seguidamente estimuladas con las hormonas indicadas durante 1 hora. Las concentraciones utilizadas fueron 5-HT 50  $\mu$ M, E2 40 nM y Dex (dexametasona) 100nM. Los núcleos de las células marcadas con el anticuerpo de c-Jun se muestran con DAPI. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. Barra de escala 100  $\mu$ m.



**Fig. 27. c-Fos activado por 5-HT podría interactuar con GR en el núcleo de las hMSCs.** Imágenes de microscopía confocal de las preparaciones de la Fig. 26. Barra de escala 20  $\mu$ m.

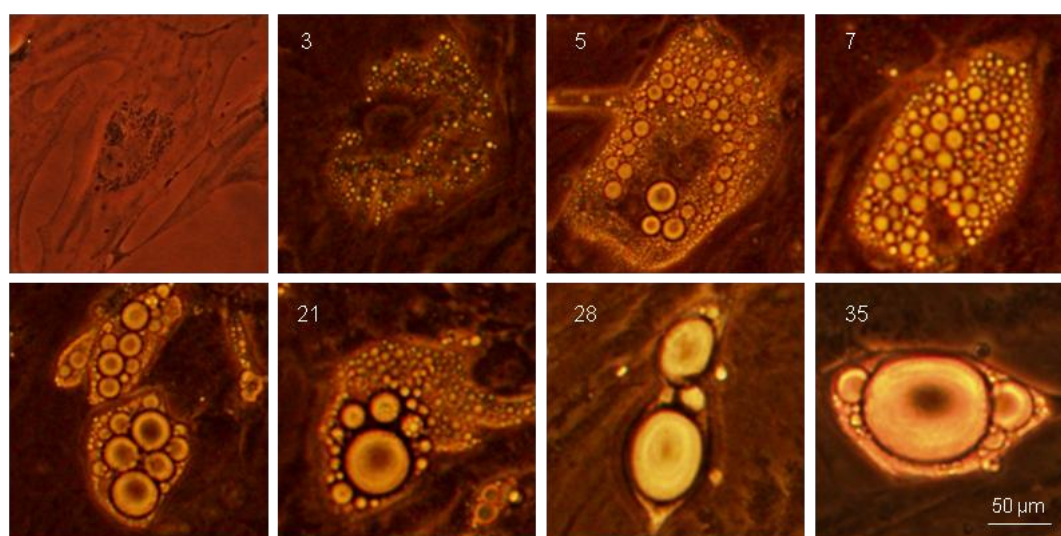


## 2. La serotonina estimula la adipogénesis en hMSCs

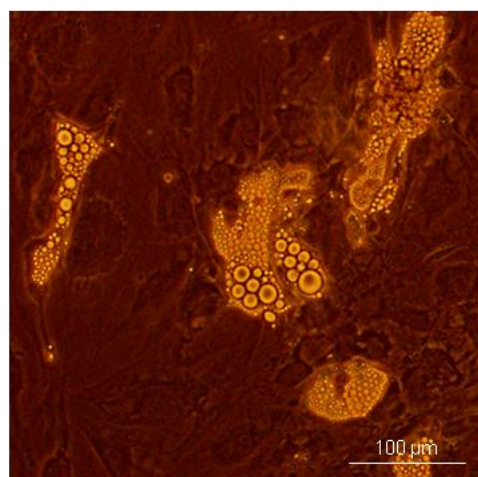
### 2.1 Caracterización de la diferenciación adipocítica de hMSCs

Las células hMSCs aisladas de médula ósea tienen el potencial para diferenciarse en adipocitos en un proceso durante el que sufren cambios morfológicos aparentes, pasando de la morfología fibroblástica característica de las MSCs a la típica de un adipocito maduro.

A



B



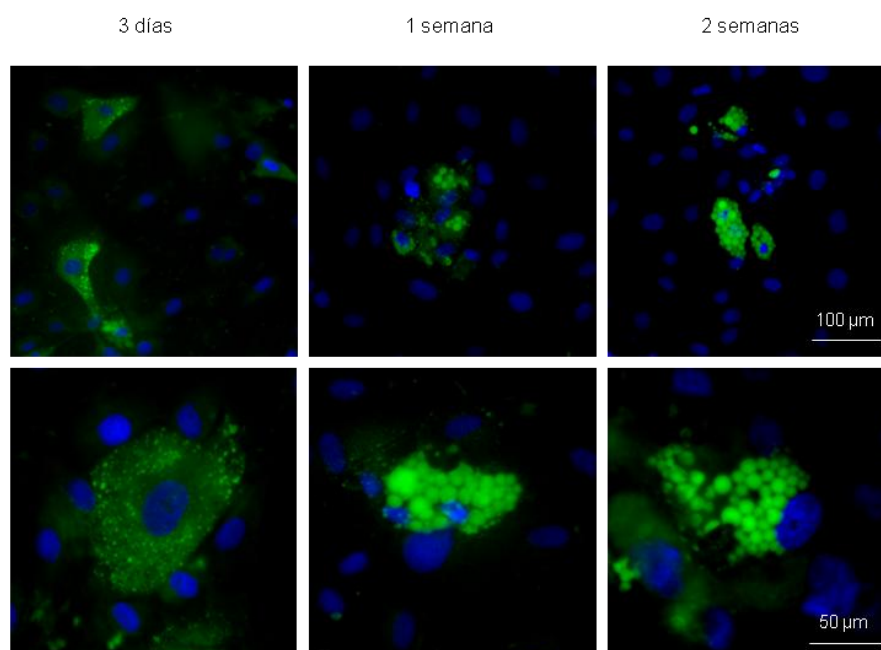
**Fig. 28. Diferenciación adipocítica de hMSCs.**

**(A)** Estudio de los cambios morfológicos experimentados por las hMSCs durante su diferenciación a adipocitos. Las células se cultivaron en medio de crecimiento hasta alcanzar la confluencia y entonces fueron mantenidas en medio adipogénico AIM durante 5 semanas. Se tomaron fotografías en los tiempos indicados, eligiendo en cada caso las células en estadios de diferenciación más avanzados. Las imágenes son representativas de los distintos ensayos de diferenciación con AIM mostrados en este trabajo.

**(B)** Detalle de la heterogeneidad de un cultivo de hMSCs mantenido con AIM durante 3 semanas.

La Fig. 28 recoge imágenes representativas del proceso de diferenciación adipocítica en los cultivos de hMSCs inducidos con el medio de inducción adipogénica (AIM). Puede observarse el desarrollo de pequeñas vesículas lipídicas, fácilmente distinguibles en la imagen por su alta refracción, que se van acumulando en el citoplasma. Con la progresión del proceso de

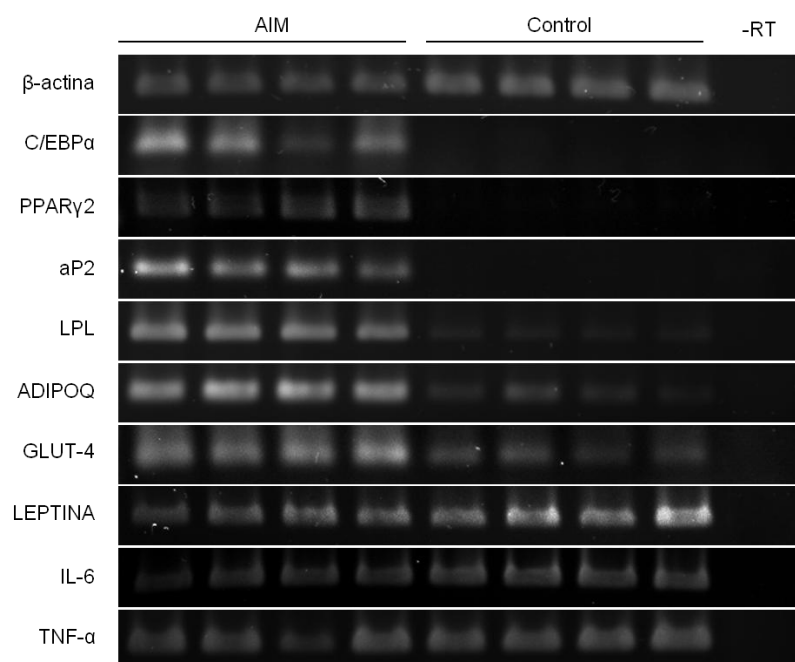
diferenciación, estas vesículas se fusionan entre sí hasta dar lugar a una única y gran vesícula lipídica que caracteriza al adipocito maduro.



**Fig. 29. Identificación de vesículas lipídicas en cultivos de hMSCs diferenciados con AIM.** Las hMSCs se cultivaron en medio adipogénico AIM durante 3 días y 1 y 2 semanas. Seguidamente, las células se fijaron e incubaron con el marcador específico de lípidos Bodipy 488. Los núcleos aparecen marcados con DAPI.

El análisis clonal de MSCs derivadas de una variedad de especies revela que las MSCs multipotentes representan sólo entre un 20 y un 40% del total de la población MSC (Kuznetsov et al., 1997). En la Fig. 13B se muestra una fotografía representativa de un cultivo de hMSCs mantenido bajo condiciones adipogénicas (AIM) durante tres semanas. En ella puede apreciarse la heterogeneidad del cultivo, en el que observamos células en diferentes estadios de diferenciación adipocítica entre una amplia población de células no diferenciadas. En la Fig. 29 mostramos cultivos de hMSCs mantenidos con medio inductor de adipogénesis durante distintos tiempos (tres días, una semana y dos semanas) y seguidamente incubados con el marcador específico de lípidos Bodipy 488. De este modo comprobamos la naturaleza lipídica de las vesículas desarrolladas en el citoplasma de las hMSCs en respuesta al cultivo con medio adipogénico. Asimismo, analizamos la expresión de mensajeros de distintos genes que definen el programa de diferenciación adipocítica en estos cultivos. Analizamos mediante RT-PCR cuatro cultivos de hMSCs mantenidos en condiciones de crecimiento (control) frente a otros cuatro mantenidos en condiciones de diferenciación con AIM durante dos semanas. En la Fig. 30 se observan resultados representativos de tres ensayos independientes. Se aprecia la expresión de PPAR $\gamma$ 2 (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 2*), C/EBP $\alpha$  (*CCAAT-enhancer binding protein  $\alpha$* ) y aP2 (*adipocyte fatty acid binding protein*), genes principales en la adipogénesis, específicamente en las células diferenciadas, no detectándose mensajeros en los cultivos control. Igualmente, en las células inducidas con AIM, y aunque la PCR no es cuantitativa, se aprecia una mayor expresión génica de LPL (*lipoprotein lipase*),

adiponectina (ADIPOQ) y el transportador de glucosa GLUT-4, todos ellos genes con una alta expresión en adipocitos. Además, detectamos la expresión de las adipoquinas leptina, IL-6 (*interleukin-6*) y TNF- $\alpha$  (*tumour necrosis factor  $\alpha$* ), proteínas secretadas típicamente por los adipocitos, en hMSCs cultivadas en cada una de las dos condiciones. Este resultado sugiere que las hMSCs pueden ser, junto con los adipocitos, células secretoras de estas adipoquinas en la médula ósea, lo que concuerda con lo publicado en distintos trabajos (De Luca et al.; Noh).

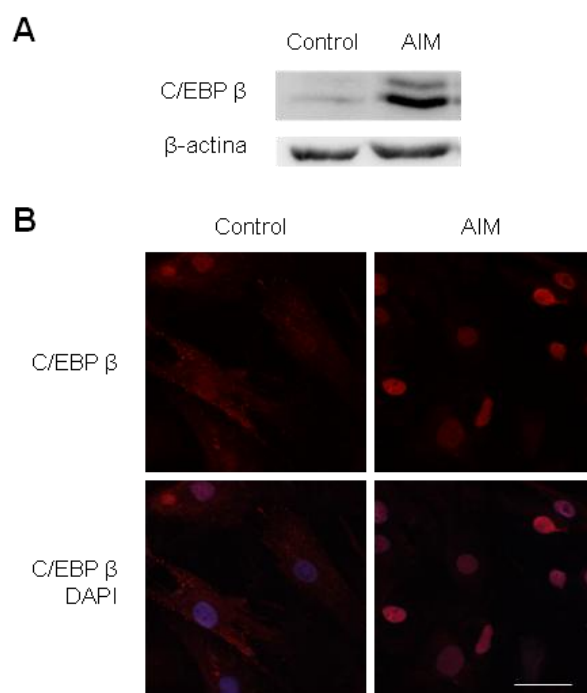


**Fig. 30. Expresión de genes característicos de adipocito en hMSCs diferenciadas con AIM.** Se aisló el ARN total de 4 cultivos de hMSCs mantenidos en medio adipogénico AIM durante 2 semanas y de 4 cultivos de hMSCs en condiciones de crecimiento (control). A continuación, se analizó mediante RT-PCR la expresión de los genes indicados. Como control de la cantidad de ARNm total utilizada se muestra la expresión de  $\beta$ -actina.

Como factor clave en la diferenciación adipocítica en la Fig. 31A se muestra, mediante análisis de extractos proteicos totales por *Western-blot*, el incremento en la expresión de C/EBP $\beta$  en las hMSCs en respuesta a dos semanas de inducción con AIM en relación al cultivo en condiciones de crecimiento. En la Fig. 31B podemos observar una inmunocitoquímica de estas mismas células en la que se aprecia como además de haber una mayor producción de C/EBP $\beta$ , hay una mayor cantidad de ésta activada, como se interpreta por la acumulación nuclear de la proteína.

Los resultados mostrados se repitieron en cultivos de hMSCs de diferentes donantes sanos, demostrando que las MSCs aisladas de médula ósea siguen el programa definido de diferenciación adipocítica al ser inducidas con AIM en cultivo.

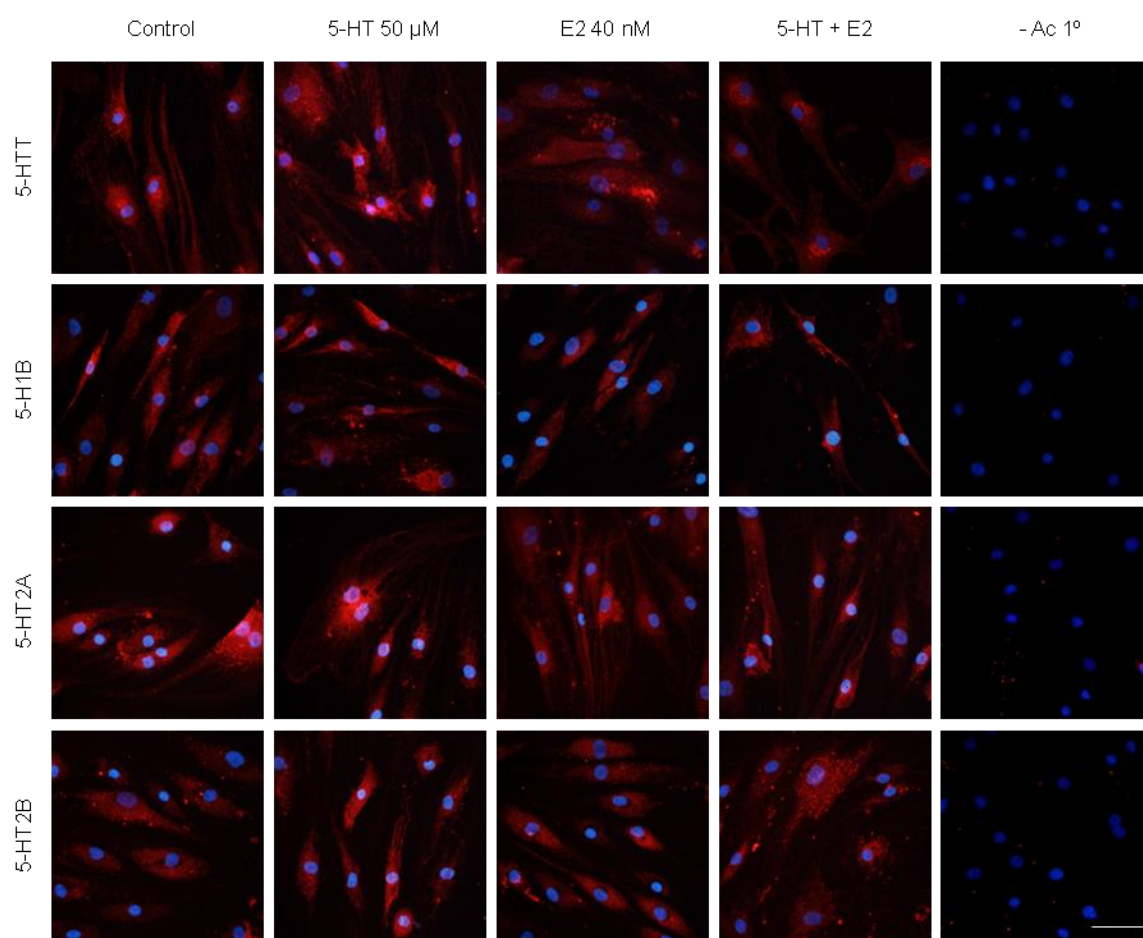




**Fig. 31. Expresión y localización nuclear de C/EBPβ en hMSCs diferenciadas con AIM.** (A) Análisis de la expresión de C/EBPβ en respuesta a la inducción adipogénica. Se analizaron extractos proteicos totales mediante Western-blot contra C/EBPβ de hMSCs mantenidas en medio de crecimiento (control) o en AIM durante 2 semanas. (B) Análisis inmunocitoquímico de la acumulación nuclear de C/EBPβ en respuesta a la inducción adipogénica. Las condiciones analizadas (control y AIM) fueron las mismas que en A. Los núcleos aparecen marcados con DAPI. Barra de escala 50 μm.

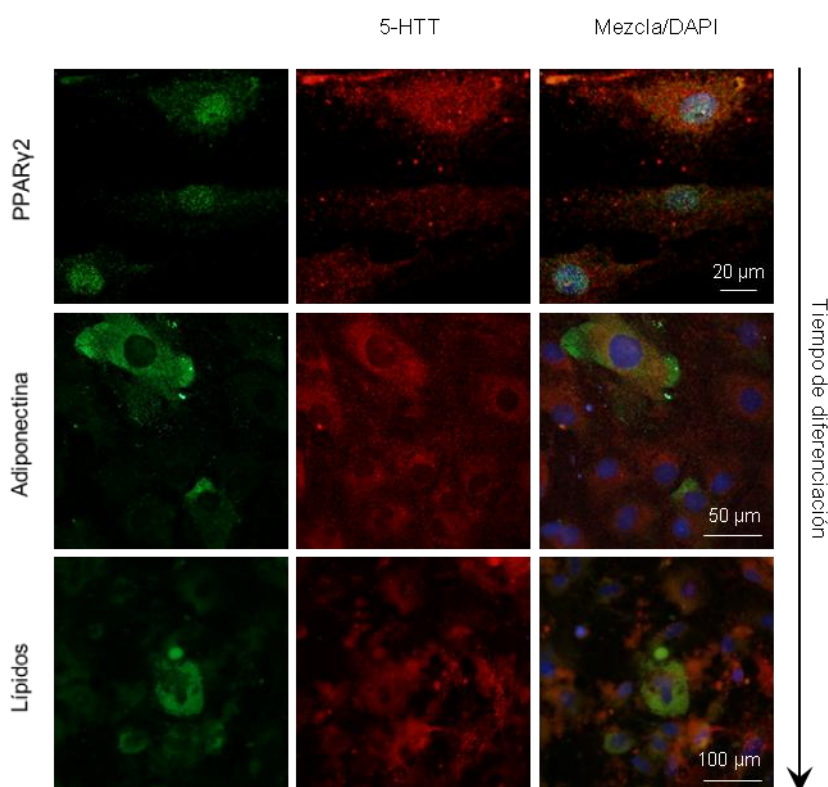
### 2.1.1. Las hMSCs mantienen la expresión del sistema para sintetizar y responder a 5-HT durante su programa adipogénico

Los ratones *knockout* para Htr2c (5-HT<sub>2C</sub>) desarrollan obesidad como resultado de un control anormal de la ingesta de alimentos, lo que indica el papel de este receptor como responsable del control serotoninérgico del apetito en el SNC (Tecott et al., 1995). Por otra parte, dos trabajos muy recientes muestran que la serotonina regula directamente tanto la diferenciación (Kinoshita et al.) como la función del adipocito (Stunes et al.) vía circulación sanguínea y/o mediante mecanismos paracrinós y autocrinós, y no sólo indirectamente vía SNC como se había asumido previamente. Los autores determinan además la expresión de Tph-1, 5-HTT y varios receptores serotoninérgicos (5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>) tanto en preadipocitos 3T3-L1 como en adipocitos primarios aislados de tejido visceral de rata. Sin embargo, aún no se ha estudiado la posible implicación de la serotonina en la diferenciación adipogénica de las MSCs en la médula ósea. Tampoco se ha determinado si los adipocitos medulares derivados de MSCs expresan, como los adipocitos viscerales, proteínas específicas del sistema de señalización serotoninérgico. Con estos antecedentes, y puesto que nuestros resultados indican la expresión de varios componentes del sistema serotoninérgico en hMSCs cultivadas en condiciones de crecimiento, analizamos si las hMSCs en proceso de diferenciación adipocítica seguían expresando estas proteínas.



**Fig. 32. Las hMSCs expresan el sistema para sintetizar y responder a 5-HT durante su programa adipogénico.** Análisis inmunocitoquímico para la expresión específica de las proteínas 5-HTT, 5-HT1B, 5-HT2A y 5-HT2B. Las hMSCs se cultivaron en medio adipogénico AIM durante 2 semanas en presencia o no de 5-HT 50 $\mu$ M, E2 40 nM o una combinación de ambas hormonas. Los núcleos aparecen marcados con DAPI. Barra de escala 100  $\mu$ m.

Con este fin, realizamos inmunocitoquímicas específicas contra estas proteínas en cultivos de hMSCs mantenidos durante dos semanas en AIM. Asimismo, y teniendo en cuenta nuestros datos que indican una relación entre 5-HT y E2 en estas células, realizamos este análisis en las mismas condiciones pero suplementando el medio inductor con 5-HT 50  $\mu$ M, E2 40 nM o una combinación de ambas. Como se observa en la Fig. 32, en todas las condiciones de diferenciación, con suplemento hormonal o no, se detecta la expresión de 5-HTT, 5-HT1B, 5-HT2A y 5-HT2B. Por tanto, este resultado sugiere un posible papel para la serotonina en la diferenciación/función de los adipocitos derivados de las hMSCs medulares.



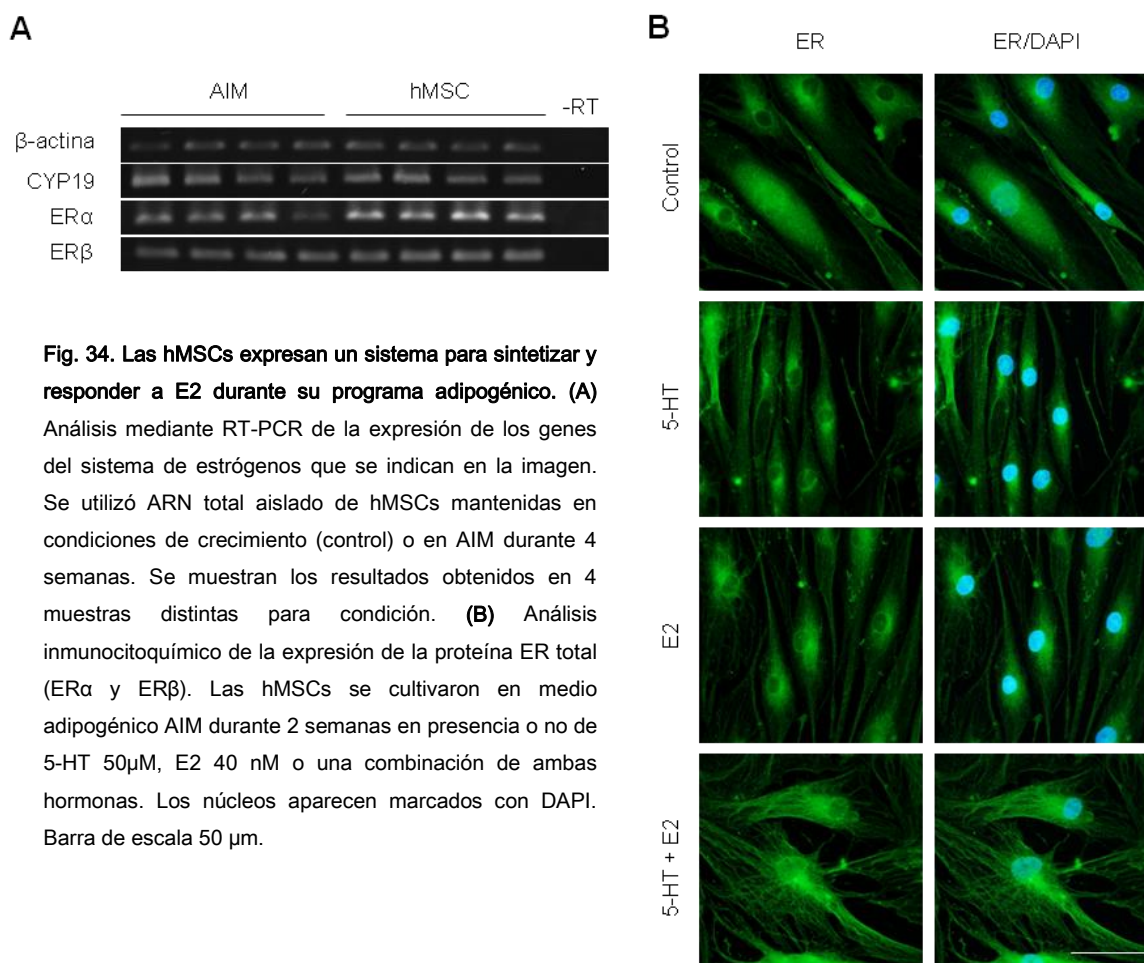
**Fig. 33. Las hMSCs expresan proteínas específicas de la señalización de 5-HT durante su programa adipogénico.** Análisis inmunocitoquímico de la coexpresión de 5-HTT y tres marcadores de distintas fases de la diferenciación adipocítica. Las hMSCs se mantuvieron en medio adipogénico durante una (PPAR $\gamma$ 2), dos (adiponectina) y tres semanas (lípidos, marcados con Bodipy 488). Los núcleos se marcaron con DAPI.

Anteriormente mostramos el comportamiento heterogéneo de las hMSCs de los cultivos adipogénicos (Fig. 28B). Ante esta observación, comprobamos que las células que mostraban una inmunocitoquímica positiva para proteínas del sistema serotoninérgico estaban efectivamente desarrollando un programa adipogénico. Para ello realizamos inmunocitoquímicas separadas para 5-HTT junto a uno de tres indicadores de la progresión de la adipogénesis: PPAR $\gamma$ 2, adiponectina y vesículas lipídicas (detectadas con Bodipy 488), utilizando cultivos de hMSCs inducidos con AIM durante una, dos y tres semanas, respectivamente. Los resultados se muestran en la Fig. 33, donde se observa la coexpresión de 5-HTT y PPAR $\gamma$ 2 activado (nuclear), 5-HTT y adiponectina (proteína específica de adipocito) y 5-HTT y vesículas lipídicas (características de preadipocitos/adipocitos diferenciados) durante la diferenciación adipocítica de hMSCs. Por tanto comprobamos que, efectivamente, estas las hMSCs expresan proteínas específicas de la señalización de 5-HT durante su diferenciación a adipocitos.

### 2.1.2. Los estrógenos durante el programa adipogénico de las hMSCs

Las células hMSCs de médula ósea expresan el enzima aromatasa para la síntesis de estrógenos y los receptores ER $\alpha$  y ER $\beta$  (Fig. 12). Como puede observarse en la Fig. 34A esta expresión persiste en los adipocitos derivados en cultivo, detectándose la expresión de estas

tres proteínas mediante RT-PCR en hMSCs inducidas con medio adipogénico durante cuatro semanas.



**Fig. 34. Las hMSCs expresan un sistema para sintetizar y responder a E2 durante su programa adipogénico. (A)** Análisis mediante RT-PCR de la expresión de los genes del sistema de estrógenos que se indican en la imagen. Se utilizó ARN total aislado de hMSCs mantenidas en condiciones de crecimiento (control) o en AIM durante 4 semanas. Se muestran los resultados obtenidos en 4 muestras distintas para condición. **(B)** Análisis inmunocitoquímico de la expresión de la proteína ER total (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ). Las hMSCs se cultivaron en medio adipogénico AIM durante 2 semanas en presencia o no de 5-HT 50 $\mu$ M, E2 40 nM o una combinación de ambas hormonas. Los núcleos aparecen marcados con DAPI. Barra de escala 50  $\mu$ m.

La localización celular de ER en hMSCs en adipogénesis y su respuesta al estímulo con E2 y/o 5-HT se muestra en la Fig. 34B. Observamos la expresión específica de ER en hMSCs bajo inducción adipogénica. En las cuatro condiciones analizadas, la proteína ER se detecta en el citoplasma, no detectándose ER en el núcleo celular. Además, igual que encontramos para las hMSCs cultivadas en condiciones de crecimiento, parte de la proteína ER parece estar asociada a microtúbulos en las hMSCs en adipogénesis. Este resultado sugiere que la acción del 17 $\beta$ -estradiol en la adipogénesis de hMSCs podría ser mediada por su señalización no canónica, induciendo la activación de quinasas citoplasmáticas independientemente de la actividad transcripcional de ER. Precisamente, esta señalización no genómica parece ser la responsable de la acción del E2 sobre la diferenciación osteoblástica de MSCs, donde se ha demostrado que la señalización de E2 es independiente de la unión de ER al ADN (Almeida M., 2010).

## 2.2 Regulación de la adipogénesis por 5-HT en hMSCs

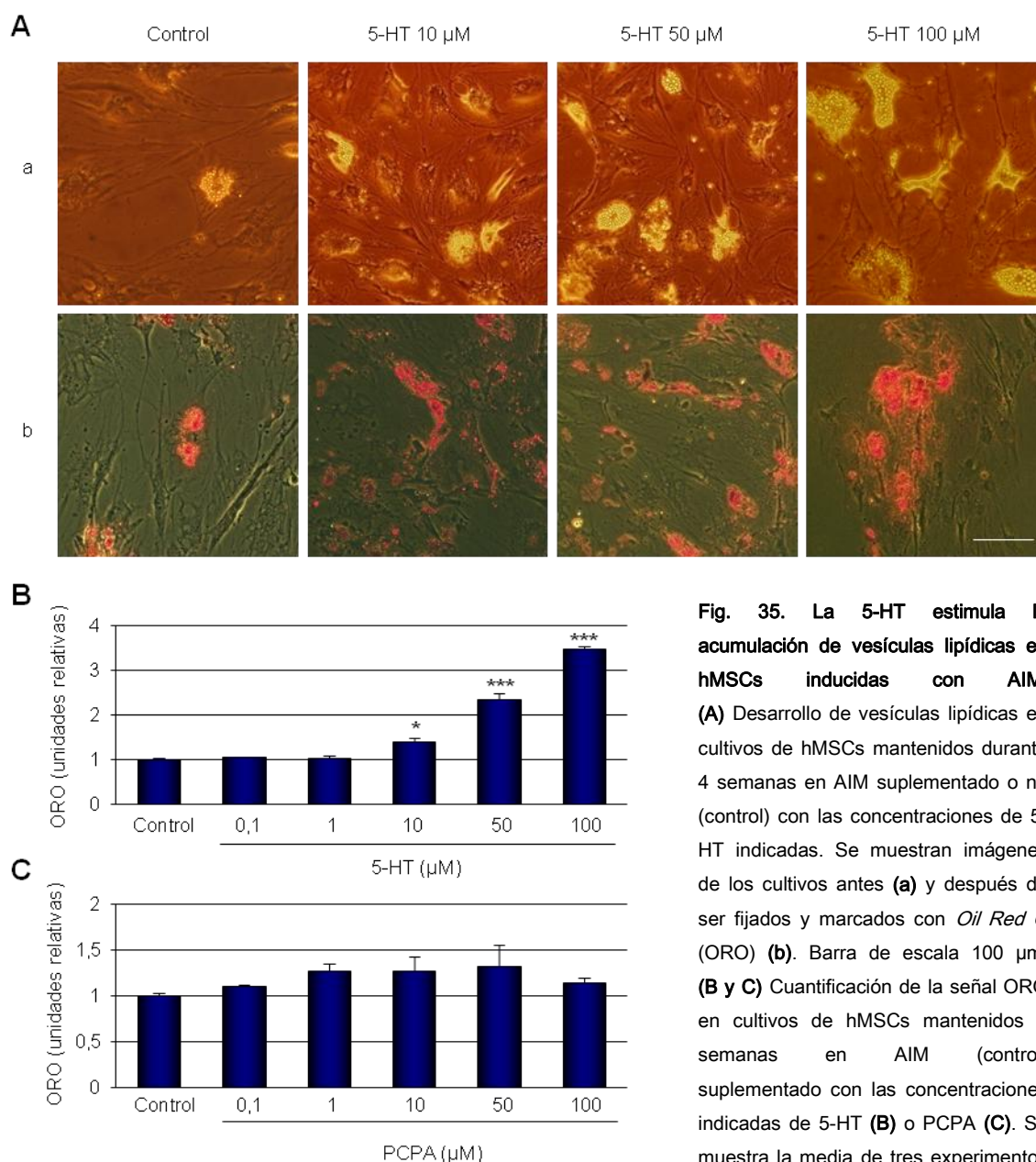
Se ha sugerido que la serotonina puede ser un factor paracrino/autocrino requerido para la diferenciación de adipocitos (Kinoshita et al.), actuando principalmente a través de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>. Consecuentemente, diseñamos estrategias para obtener información sobre el papel de la serotonina en la diferenciación adipogénica de las MSCs de la médula ósea humana.

### 2.2.1 La 5-HT estimula la acumulación de vesículas lipídicas durante la adipogénesis de hMSCs

Para valorar si la serotonina afecta a la diferenciación de adipocitos desde las hMSCs cuantificamos la cantidad de vesículas lipídicas desarrolladas en el citoplasma de estas células en respuesta a 5-HT. Para ello, incubamos las células en medio inductor de adipogénesis (AIM) suplementado o no (control) con concentraciones crecientes de 5-HT (0,1-100  $\mu$ M) durante cuatro semanas. A continuación se marcó y cuantificó el contenido lipídico del cultivo utilizando *Oil Red O* (ORO) como se describe en *Materiales y Métodos*. En la Fig. 35 se observa que la serotonina estimula la diferenciación adipocítica de las hMSCs de una manera dependiente de su concentración, incrementándose el contenido lipídico en más de dos y tres veces en respuesta a 5-HT 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M, respectivamente (Fig. 35B). En la Fig. 33A se muestran imágenes representativas de estos cultivos, antes y después de ser fijados y teñidos con ORO, donde se aprecia claramente el mayor desarrollo de vesículas lipídicas en respuesta a 5-HT.

Puesto que nuestros datos indican que las hMSCs expresan Tph-1, enzima para la síntesis de 5-HT, determinamos la posible implicación de la actividad Tph-1 en la diferenciación adipocítica de estas células. Para ello utilizamos el inhibidor específico e irreversible de la actividad Tph *p*-clorofenilalanina (PCPA). Cultivamos las hMSCs en AIM suplementado con concentraciones crecientes de PCPA (0,1-100  $\mu$ M) durante cuatro semanas y cuantificamos el contenido lipídico de los cultivos con ORO. Como se muestra en la Fig. 35C, la inhibición de la actividad Tph-1 por PCPA no modificó la cantidad de vesículas lipídicas en el cultivo. Este dato parece indicar que la actividad Tph-1 no opera en la diferenciación adipocítica de las hMSCs en cultivo, mientras que la 5-HT exógena sí tiene un claro efecto estimulador de la adipogénesis en estas células. Por tanto, nuestros resultados sugieren que la serotonina no estimula la diferenciación adipocítica de las hMSCs de la médula ósea mediante un mecanismo autocrino, pudiendo hacerlo a través de mecanismos paracrinós y/o endocrinós.

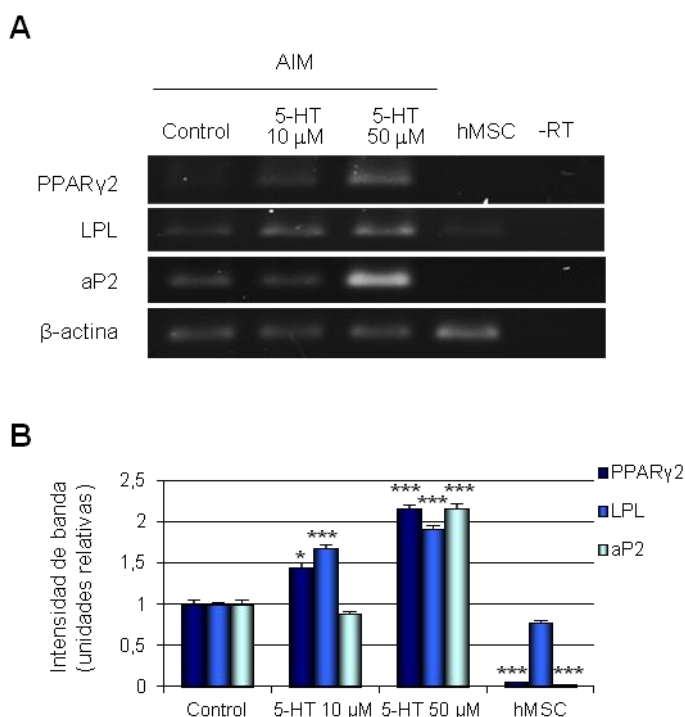




**Fig. 35. La 5-HT estimula la acumulación de vesículas lipídicas en hMSCs inducidas con AIM.** (A) Desarrollo de vesículas lipídicas en cultivos de hMSCs mantenidos durante 4 semanas en AIM suplementado o no (control) con las concentraciones de 5-HT indicadas. Se muestran imágenes de los cultivos antes (a) y después de ser fijados y marcados con *Oil Red O* (ORO) (b). Barra de escala 100  $\mu$ m. (B y C) Cuantificación de la señal ORO en cultivos de hMSCs mantenidos 4 semanas en AIM (control) suplementado con las concentraciones indicadas de 5-HT (B) o PCPA (C). Se muestra la media de tres experimentos independientes.

## 2.2.2 La 5-HT estimula la expresión de genes del linaje adipogénico durante la diferenciación adipocítica de hMSCs

En vista del resultado anterior, analizamos mediante RT-PCR la expresión de los genes específicos de adipocito PPAR $\gamma$ 2, aP2 y LPL en cultivos adipogénicos suplementados con 5-HT. Para ello utilizamos el ARN total de hMSCs cultivadas durante dos semanas en AIM suplementado o no con 5-HT 10  $\mu$ M y 50  $\mu$ M. Como control de la diferenciación, analizamos el ARN de hMSCs mantenidas en medio de crecimiento.



**Fig. 36. La 5-HT estimula la expresión de genes del linaje adipogénico en hMSCs.**

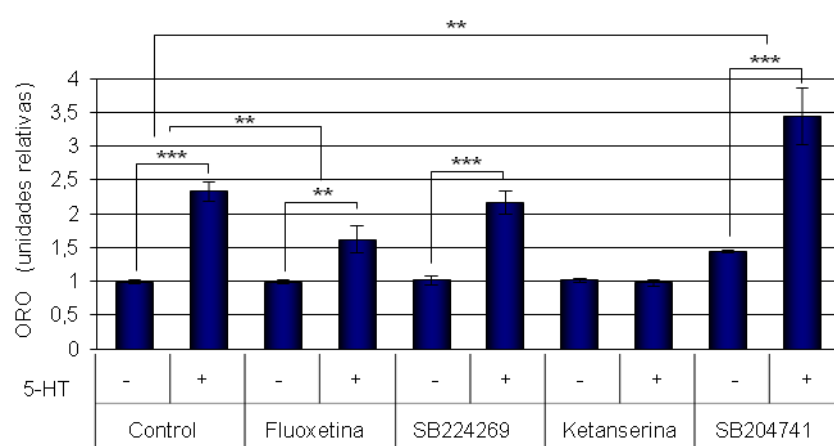
**(A)** Análisis mediante RT-PCR de la expresión génica de aP2, LPL y PPAR $\gamma$ 2. Las hMSCs se cultivaron durante 2 semanas en medio de diferenciación AIM suplementado o no (control) con las concentraciones de 5-HT indicadas. A continuación se aisló el ARN total y se realizaron las distintas reacciones de RT-PCR. Como control de la diferenciación se incluyó el análisis de hMSCs mantenidas en condiciones de crecimiento (hMSCs). **(B)** Cuantificación mediante densitometría de la intensidad de banda de los geles anteriores. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Como puede observarse en la Fig. 36, y en concordancia con los resultados anteriores, el estímulo serotoninérgico condujo a un incremento en la expresión de estos tres genes en las hMSCs inducidas con AIM. Por tanto, los resultados indican que el suplemento del medio adipogénico con 5-HT lleva a una mayor expresión de genes del linaje adipocítico en las hMSCs, lo que apoya la acción proadipogénica de la 5-HT en estos cultivos.

### 2.2.3 El estímulo proadipogénico de la serotonina es mediado por la activación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> y negativamente regulado por la actividad 5-HT<sub>2B</sub>

La posible participación de los receptores serotoninérgicos en la acción proadipogénica de la serotonina en las hMSCs se analizó utilizando los siguientes inhibidores específicos para las distintas proteínas: fluoxetina 1  $\mu$ M (5-HTT), SB224289 1  $\mu$ M (5-HT<sub>1B</sub>), ketanserina 10  $\mu$ M (5-HT<sub>2A</sub>) y SB204741 1  $\mu$ M (5-HT<sub>2B</sub>). En la Fig. 37 se muestran los resultados obtenidos tras cuatro semanas de inducción adipogénica en presencia de los distintos inhibidores y 5-HT 50  $\mu$ M. La inhibición del transportador 5-HTT con fluoxetina reduce significativamente la respuesta proadipogénica de las hMSCs a 5-HT, mientras que al inhibir el receptor 5-HT<sub>2A</sub> las hMSCs no responden al estímulo serotoninérgico. La inhibición del receptor 5-HT<sub>2B</sub>, por el contrario, conduce a un incremento significativo en esta respuesta de las hMSCs a 5-HT. La actividad del receptor 5-HT<sub>1B</sub> no parece intervenir. Por tanto, los resultados sugieren que la activación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> por 5-HT en hMSCs estimula su diferenciación adipocítica, siendo su actividad necesaria para esta respuesta celular a 5-HT. A

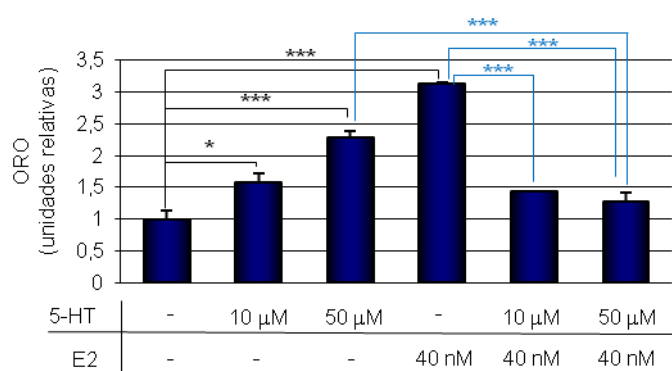
su vez, los datos muestran un papel tanto para el receptor 5-HT<sub>2B</sub> como para el 5-HTT como reguladores de este estímulo, lo que indica que la regulación de la adipogénesis de hMSCs por 5-HT es compleja e implica la activación de distintas proteínas del sistema de señalización serotoninérgico.



**Fig. 37. 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2B</sub> median la acción proadipogénica de la 5-HT.** Cuantificación de lípidos mediante ORO en cultivos de hMSCs inducidas con AIM durante 4 semanas en presencia o no (control) de los inhibidores específicos indicados y suplementado o no con 5-HT 50  $\mu$ M. Se muestra la media de tres experimentos independientes.

## 2.2.4 Interdependencia entre las acciones proadipogénicas de 5-HT y E2

Los resultados mostrados indican una interacción entre algunas de las acciones de 5-HT y E2 en las hMSCs, por lo que nos propusimos estudiar la respuesta proadipogénica de las hMSCs a 5-HT en presencia de E2. Para ello, mantuvimos durante cuatro semanas cultivos de hMSCs en medio inductor de adipogénesis (AIM) suplementado o no con 5-HT (10 y 50  $\mu$ M) en presencia/ausencia de E2 40 nM.



**Fig. 38. Interdependencia entre las acciones proadipogénicas de 5-HT y E2 en hMSCs.** Cuantificación con ORO del contenido lipídico en cultivos de hMSCs mantenidos en AIM suplementado o no (control) con las concentraciones y combinaciones indicadas de 5-HT y E2 durante 4 semanas.

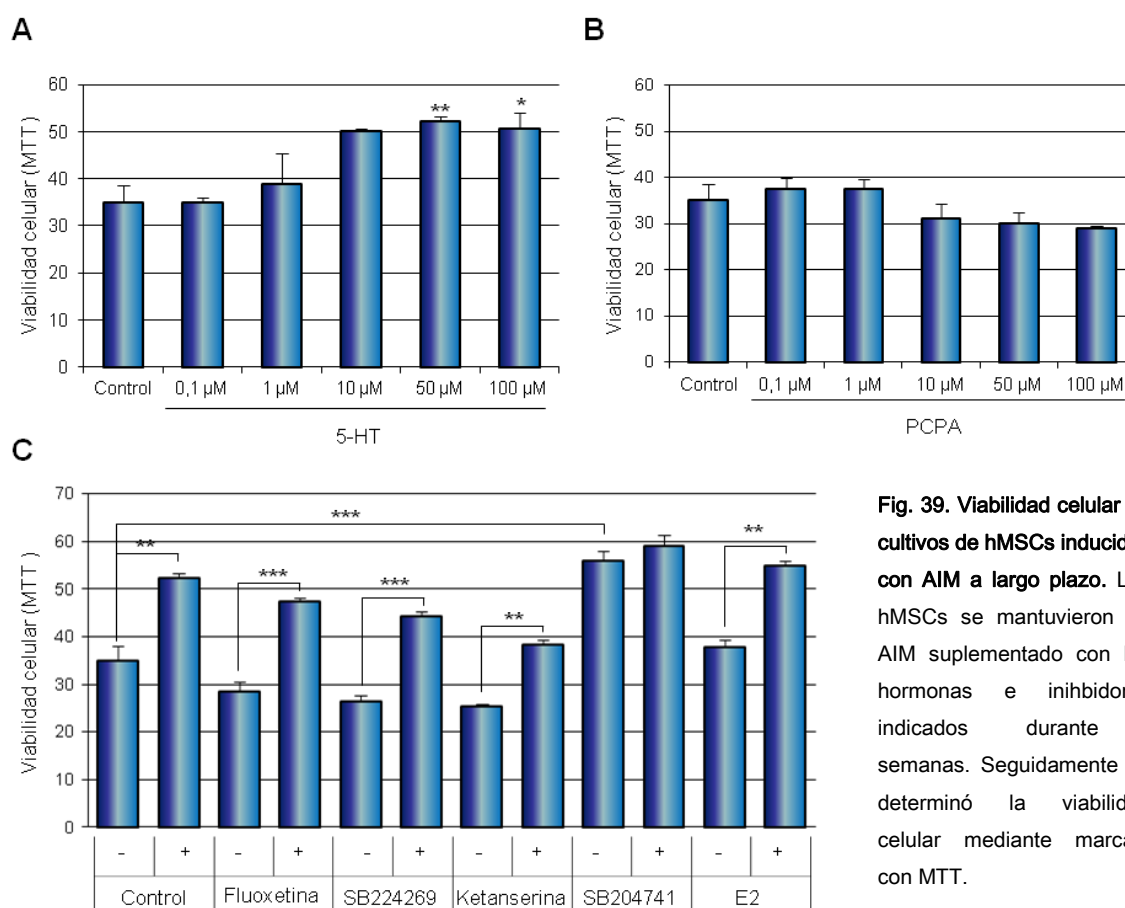
En la Fig. 38 podemos observar como, en contradicción con lo publicado, el suplemento de AIM con E2 40 nM condujo a un fuerte incremento en el contenido lipídico del cultivo, alcanzándose valores mayores que con el estímulo serotoninérgico. Sin embargo, cuando el medio inductor fue suplementado además de con E2 con 5-HT, las acciones proadipogénicas



de ambas hormonas parecieron abolirse. Como se observa en la Fig. 36, la cantidad de vesículas lipídicas generadas en estos cultivos resultó próxima al control. Estos resultados indican que el E2, al igual que la 5-HT, estimula la diferenciación adipocítica de hMSCs, así como que la acción de cada una de estas hormonas es dependiente de la concentración de la otra.

### **2.3 La 5-HT incrementa la viabilidad celular en los cultivos adipogénicos de hMSCs inducidos a largo plazo**

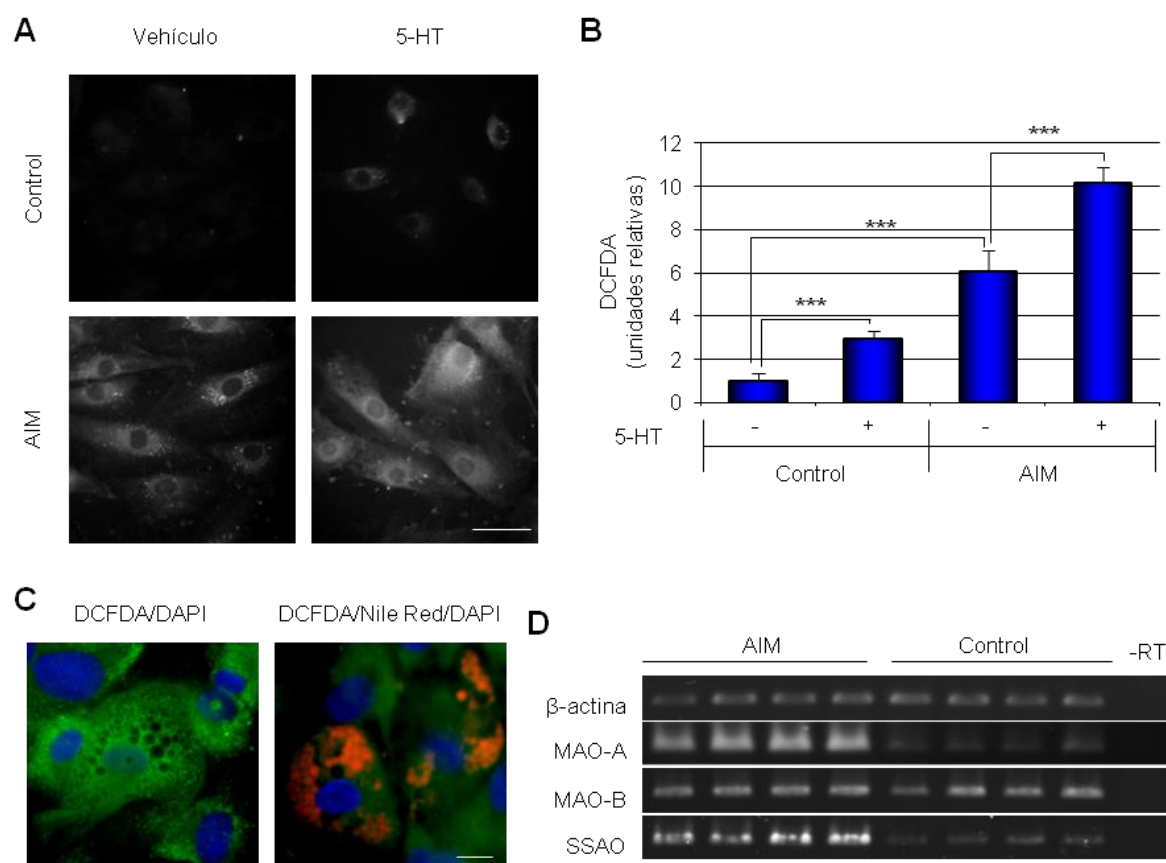
Durante nuestro trabajo con los cultivos adipogénicos de hMSCs observamos que al mantener la inducción durante largos periodos de tiempo (12-15 semanas) podíamos apreciar la muerte de algunos grupos de células en los cultivos al analizarlos bajo contraste de fases. Pero lo que nos resultó especialmente llamativo fue que los cultivos diferenciados con suplemento de 5-HT mostraban una apariencia normal, sin detectarse muerte celular aparente. Ante esta observación nos propusimos valorar este posible efecto de la serotonina sobre la viabilidad celular de estos cultivos. Para ello mantuvimos durante quince semanas cultivos de hMSCs inducidos con medio adipogénico suplementado con concentraciones crecientes de 5-HT y analizamos la viabilidad celular con MTT. En la Fig. 39A mostramos como la presencia de 5-HT conduce a un notable incremento en la viabilidad celular de estos cultivos dependiente de su concentración. Por tanto, estos resultados apoyan nuestra observación inicial e indican que el suplemento con 5-HT incrementa la viabilidad celular de los cultivos de hMSCs inducidos con medio adipogénico durante largos periodos de tiempo. También analizamos, del mismo modo, el efecto de distintas concentraciones de PCPA sobre la viabilidad de estos cultivos, para valorar el posible papel de la síntesis endógena de 5-HT en este proceso. Como se observa en la Fig. 39B, la inhibición de la actividad de Tph-1 condujo sólo a una pequeña disminución en la viabilidad celular, que no resultó significativa. Por tanto, no parece que la actividad Tph-1 sea determinante en la viabilidad celular de los cultivos adipogénicos de hMSCs.



Analizamos también la implicación de distintos receptores serotoninérgicos, así como del transportador 5-HTT, en esta acción de la serotonina. Para ello mantuvimos cultivos de hMSCs durante quince semanas con AIM suplementado con los inhibidores específicos fluoxetina 1  $\mu$ M (5-HTT), SB224289 1  $\mu$ M (5-HT1B), ketanserina 10  $\mu$ M (5-HT2A) y SB204741 1  $\mu$ M (5-HT2B), en presencia o no (control) de 5-HT 50  $\mu$ M. Seguidamente analizamos la viabilidad celular en cada condición con MTT. En la Fig. 39C puede apreciarse como la inhibición del receptor 5-HT2B conduce a un incremento significativo en la viabilidad del cultivo. Por tanto, estos resultados sugieren un importante papel para el receptor 5-HT2B en la viabilidad de los cultivos adipogénicos de hMSCs mantenidos a largo plazo. Precisamente, en cardiomiocitos se ha descrito que la inhibición de la actividad 5-HT2B, utilizando este mismo inhibidor, disminuye la apoptosis tanto *in vitro* como *in vivo* (Bai CF., 2010).

## 2.4 Las 5-HT induce la generación de ROS durante la adipogénesis de hMSCs

La generación de ROS durante la adipogénesis se ha descrito tanto en preadipocitos 3T3-L1 (Lee et al., 2009) como durante las primeras etapas de la diferenciación adipogénica de MSCs (Kanda et al.), mostrando un papel estimulador de la adipogénesis.



**Fig. 40. Altos niveles de ROS y de mensajeros para enzimas productoras de ROS en hMSCs inducidas con AIM.** (A) Análisis del contenido en ROS con DCFDA de hMSCs cultivadas en medio mínimo (control) o AIM en presencia/ausencia de 5-HT 50  $\mu$ M durante 30 minutos. (B) Cuantificación de la señal DCFDA de las imágenes de A (intensidad media/célula). (C) Visualización de ROS mediante marcaje con DCFDA en hMSCs inducidas con AIM durante 4 semanas. Para la identificación de adipocitos marcamos las vesículas lipídicas con Bodipy 488. (D) Análisis mediante RT-PCR de la expresión génica de MAO-A, MAO-B y SSAO. Se utilizó ARN total aislado de hMSCs mantenidas en condiciones de crecimiento (control) o de diferenciación (AIM) durante 4 semanas. Se muestran los resultados obtenidos en 4 muestras distintas para condición. Barra de escala 50  $\mu$ M.

Con estos datos, comprobamos la expresión de los enzimas generadores de ROS MAO-A, MAO-B y SSAO en hMSCs inducidas con AIM. Aislamos el ARN total de hMSCs mantenidas durante cuatro semanas en medio adipogénico y analizamos mediante RT-PCR la expresión génica de estas cuatro proteínas. Asimismo, analizamos el ARN de hMSCs mantenidas en condiciones de crecimiento. Como se observa en la Fig. 40D, las hMSCs

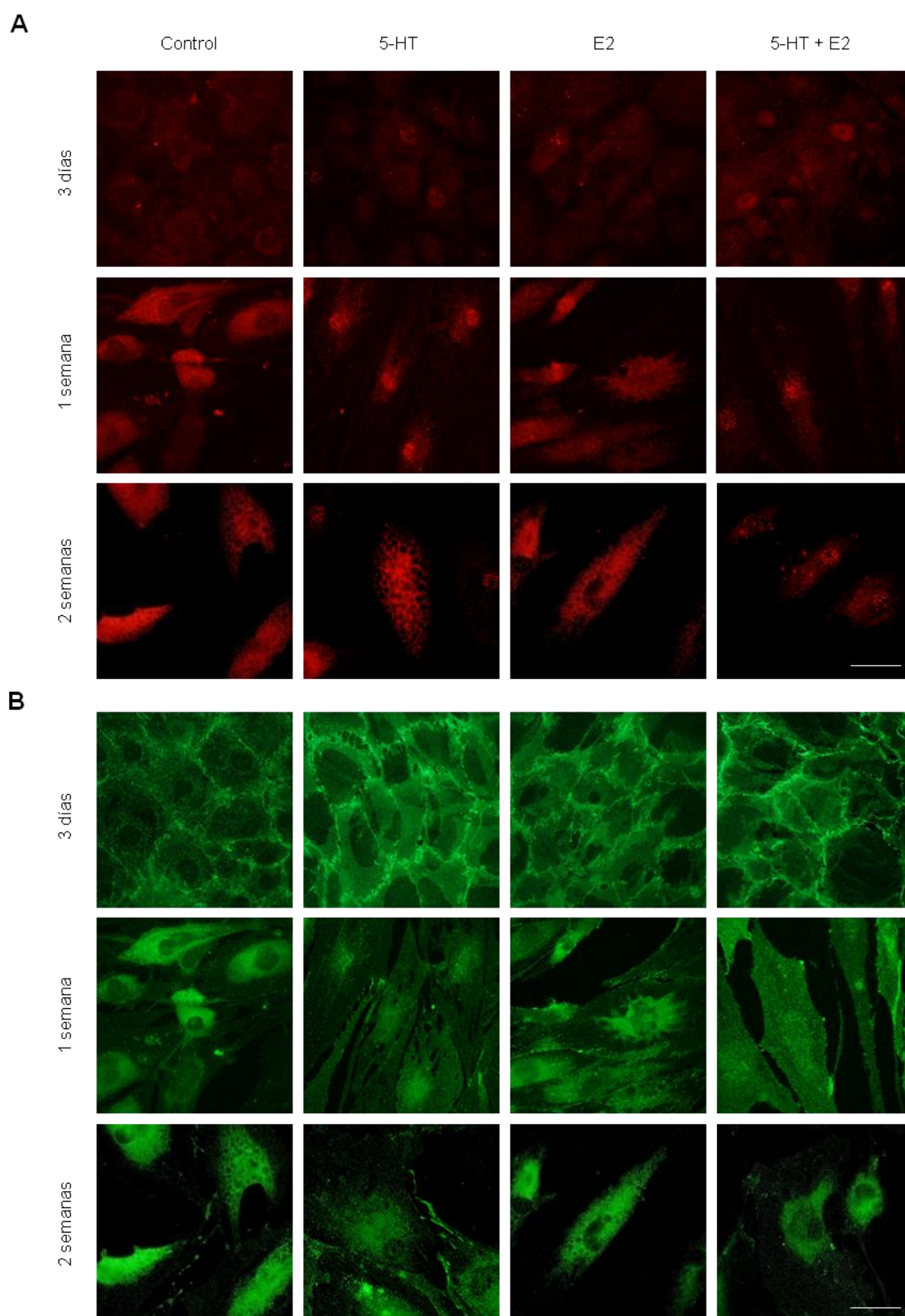
expresan MAO-A, MAO-B y SSAO, y esta expresión se incrementa cuando son diferenciadas a adipocitos en cultivo. Determinamos también la generación de  $H_2O_2$  en respuesta a 5-HT en hMSCs bajo inducción adipogénica. Para esto incubamos las células en medio de diferenciación adipogénica AIM suplementado o no con 5-HT 50  $\mu M$  durante 30 minutos y detectamos el  $H_2O_2$  generado mediante DCFDA, según se describe en *Materiales y Métodos*. Como control analizamos el contenido de  $H_2O_2$  en hMSCs mantenidas en condiciones de crecimiento. En concordancia con la literatura, la adición de AIM al cultivo de hMSCs condujo a un drástico incremento en su contenido en ROS respecto al control (Fig. 40 A y B). Además, el suplemento de AIM con 5-HT incrementó significativamente esta generación de ROS en respuesta al estímulo adipogénico. Estos resultados indican que la inducción adipogénica de hMSCs conlleva un incremento en la concentración de ROS en estas células y que la acción de la 5-HT estimula este proceso. Por tanto, los datos sugieren un papel para la señalización ROS en la adipogénesis de hMSCs que puede ser estimulado por la señalización serotoninérgica. En la Fig. 40C mostramos una imagen representativa de la señal DCFDA detectada en hMSCs mantenidas en medio adipogénico durante tres semanas. Las vesículas lipídicas aparecen además marcadas con Bodipy 488 como control de la diferenciación adipocítica de las hMSCs.

### 2.5 Regulación de factores FoxO y $\beta$ -catenina por 5-HT durante la adipogénesis de hMSCs

Puesto que nuestros resultados muestran que la 5-HT induce la generación de ROS y la activación de factores FoxO en las hMSCs, así como un incremento en la diferenciación adipocítica de estas células en cultivo, estudiamos el comportamiento de FoxO y  $\beta$ -catenina durante el programa de diferenciación adipogénica de las hMSCs y su posible regulación por 5-HT. Como los datos indican una relación entre las señalizaciones de 5-HT y de E2 en la adipogénesis de hMSCs, analizamos también si esta acción se ve modificada en condiciones de altas concentraciones de E2. Con este propósito, cultivamos las células en medio inductor de adipogénesis durante 3 días, una semana y dos semanas, en presencia o no de 5-HT 50  $\mu M$ , E2 40 nM o una combinación de ambas. Posteriormente analizamos la distribución celular de factores FoxO y  $\beta$ -catenina en estas células mediante una inmunocitoquímica doble con anticuerpos específicos para estas proteínas. Para detectar los factores FoxO utilizamos el anticuerpo que reconoce a los miembros FOXO1, FOXO3 y FOXO4 de la familia FoxO. Los resultados se muestran en la Fig. 41. Como puede observarse, en los cultivos adipogénicos de tres días  $\beta$ -catenina se localiza principalmente en las membranas en las uniones célula-célula, y la adición de 5-HT parece estimular esta localización de la proteína, pues se aprecia

más  $\beta$ -catenina en las membranas de las células tratadas con 5-HT. En los cultivos inducidos durante una semana, sin embargo, el contacto célula-célula disminuye notablemente, como es característico del programa de diferenciación adipocítica, y puede apreciarse un cambio en la localización de  $\beta$ -catenina desde las membranas al citoplasma. Aquí el estímulo serotoninérgico parece disminuir esta acumulación citoplasmática de  $\beta$ -catenina, pues en los cultivos con 5-HT, o con 5-HT y E2, observamos una señal de  $\beta$ -catenina más homogénea, sin apreciarse acumulación en el cuerpo celular. A las tres semanas de inducción,  $\beta$ -catenina ya no se detecta en las membranas y su acumulación en el citoplasma se hace más evidente. Nuevamente, en los cultivos con 5-HT la concentración de  $\beta$ -catenina parece verse disminuida. En el caso de los factores FoxO, observamos que su localización es citoplasmática a lo largo de todo el programa adipogénico. El suplemento de AIM con 5-HT, sin embargo, conduce a una acumulación nuclear de FoxO que es evidente desde el día 3 hasta las tres semanas de diferenciación adipogénica. Además, igual que para  $\beta$ -catenina, esta acción serotoninérgica no se ve modificada por la presencia de E2 en el cultivo.

Por tanto, estos resultados indican que durante el programa adipogénico de las hMSCs  $\beta$ -catenina pasa de localizarse fundamentalmente en la membrana plasmática, formando parte de las uniones adherentes en el cultivo confluyente de hMSCs, a acumularse en el citoplasma cuando las células se separan y prosigue la diferenciación adipocítica. En ningún momento del programa adipogénico observamos una acumulación nuclear evidente de  $\beta$ -catenina para regular la transcripción  $\beta$ -catenina/FoxO que distintos trabajos han sugerido. Además, la acción de la 5-HT parece promover estas situaciones en las que  $\beta$ -catenina es transcripcionalmente inactiva. Los resultados sugieren una participación de los factores FoxO en la acción serotoninérgica en estos cultivos, pues el estímulo con 5-HT condiciona su acumulación nuclear durante todo el programa adipogénico. Sin embargo, en los cultivos diferenciados con medio adipogénico estándar (AIM) los FoxO ocupan una situación fundamentalmente citoplasmática, lo que es compatible con una situación en la que estos factores no ejercen su función transcripcional. La acción de E2 en hMSCs en proceso de adipogénesis, sin embargo, no parece afectar a la distribución ni de  $\beta$ -catenina ni de los factores FoxO, ni alterar su respuesta al estímulo serotoninérgico.

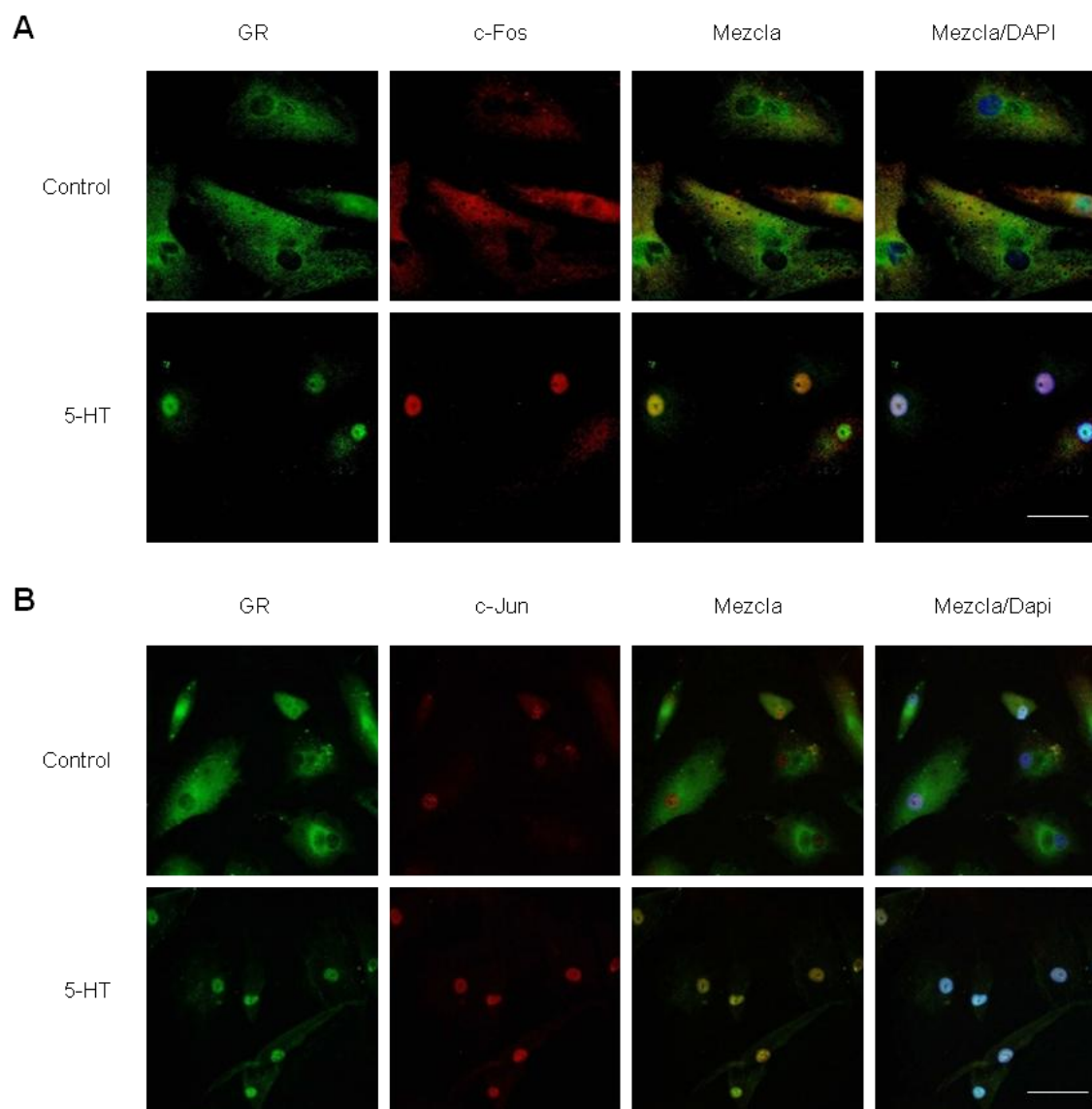


**Fig. 41.  $\beta$ -catenina y FoxO durante la adipogénesis de hMSCs en respuesta a 5-HT y E2.** Inmunocitoquímica para factores FoxO (**A**) y  $\beta$ -catenina (**B**) en hMSCs en proceso de diferenciación adipocítica. Las células se mantuvieron en AIM suplementado o no (control) con 5-HT  $\mu$ M, E2 40 nM, o una combinación de ambas durante 3 días, 1 semana y 2 semanas. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. Barra de escala 50  $\mu$ m.



## 2.6 La 5-HT modula GR y c-Fos en hMSCs bajo inducción adipogénica

Como ya comentamos, los glucocorticoides actúan sobre las MSCs estimulando su diferenciación hacia distintos linajes dependiendo de su concentración (Pittenger et al., 1999). En resultados anteriores observamos que el estímulo de hMSCs con 5-HT lleva a la activación y translocación nuclear de c-Fos, que podría interactuar con GR en el núcleo de las hMSCs expuestas a 5-HT.



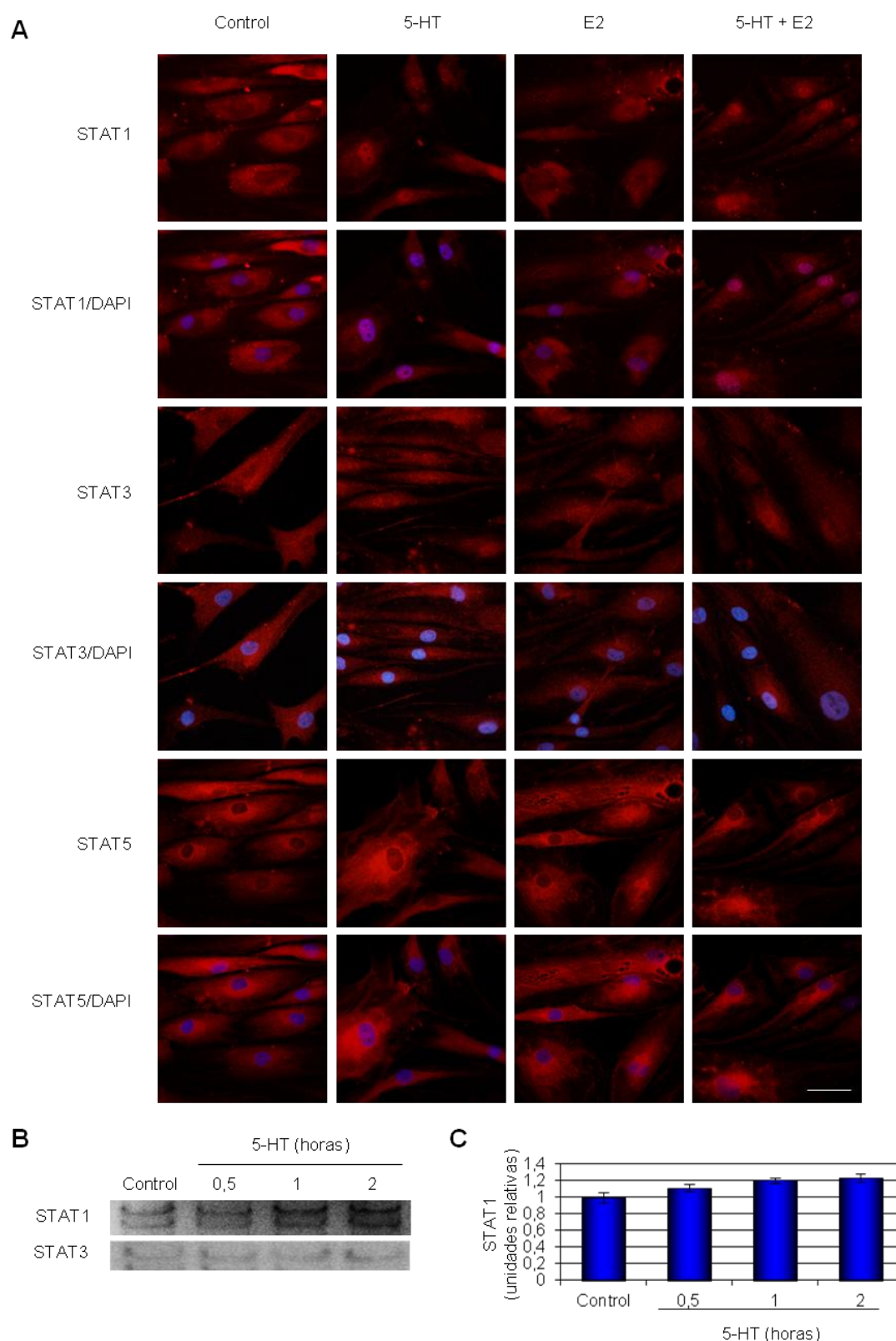
**Fig. 42. La 5-HT induce la acumulación nuclear de GR y de c-Fos en hMSCs en proceso de diferenciación adipogénica.** Inmunocitoquímicas dobles para GR y c-Fos (A) y GR y c-Jun (B) en hMSCs cultivadas durante 3 semanas en AIM suplementado o no (control) con 5-HT  $\mu$ M, E2 40 nM, o una combinación de ambas hormonas. Los núcleos aparecen marcados con DAPI y las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. Barra de escala 50  $\mu$ m.

Estudiamos la localización subcelular de GR y c-Fos en hMSCs en proceso de diferenciación adipogénica con y sin suplemento de 5-HT. Cultivamos las hMSCs en AIM durante tres semanas en presencia o no de 5-HT 50  $\mu$ M y posteriormente realizamos una inmunocitoquímica doble contra GR y c-Fos. Nuevamente, analizamos el estímulo serotoninérgico en presencia de estrógenos (E2 40nM). Como se muestra en la Fig. 42, las células diferenciadas durante tres semanas en medio estándar de diferenciación (AIM) presentan una localización predominantemente citoplásmica de GR; sólo detectamos GR en el núcleo de menos del 20% de las células de estos cultivos. En el caso de c-Fos, su localización es exclusivamente citoplasmática, no encontrándose ningún núcleo positivo para esta proteína en los cultivos con AIM. Sin embargo, el suplemento del medio adipogénico con 5-HT conduce a un incremento evidente de la translocación nuclear no solo de c-Fos, sino también de GR. Así, en estos cultivos suplementados con 5-HT cuantificamos que aproximadamente un 60% de las células presentan una acumulación nuclear de GR y en torno a un 70% de c-Fos. Estos resultados sugieren que GR no está activado para su función transcripcional en hMSCs inducidas con medio adipogénico durante tres semanas, pues no se detecta proteína GR en el núcleo de estas células. Por otra parte, el análisis inmunocitoquímico para c-Jun en estos mismos cultivos muestra una localización predominantemente nuclear de la proteína, tanto en ausencia como en presencia de estímulo serotoninérgico. Estos resultados sugieren una implicación de la señalización mediada por glucocorticoides en la acción de la 5-HT durante la diferenciación adipocítica de las hMSCs. Por tanto, sería interesante estudiar esta posible interacción entre las acciones de serotonina y glucocorticoides, dos hormonas implicadas en la regulación de la masa ósea, en los procesos de diferenciación de las MSCs medulares.

## 2.7 Proteínas STATs durante la adipogénesis de hMSCs

La vía de señalización JAK/STAT cumple un papel fundamental en el metabolismo y el desarrollo del hueso (Li J., 2013). Por otra parte, se ha sugerido que la señalización de 5-HT puede activar la vía JAK/STAT a través de la generación de ROS por activación de NAD(P)H oxidasa en otros tipos celulares (Banes AKL., 2004). Esto nos llevó a estudiar la situación de las proteínas STAT en la diferenciación adipocítica de las hMSCs y su posible respuesta al estímulo serotoninérgico. Para ello, mantuvimos cultivos de hMSCs en medio adipogénico AIM suplementado o no con 5-HT 50  $\mu$ M durante cuatro semanas. Igualmente se incluyeron cultivos suplementados con E2 40 nM o con ambas hormonas conjuntamente y se realizaron inmunocitoquímicas contra las proteínas STAT-1, STAT-3 y STAT-5.

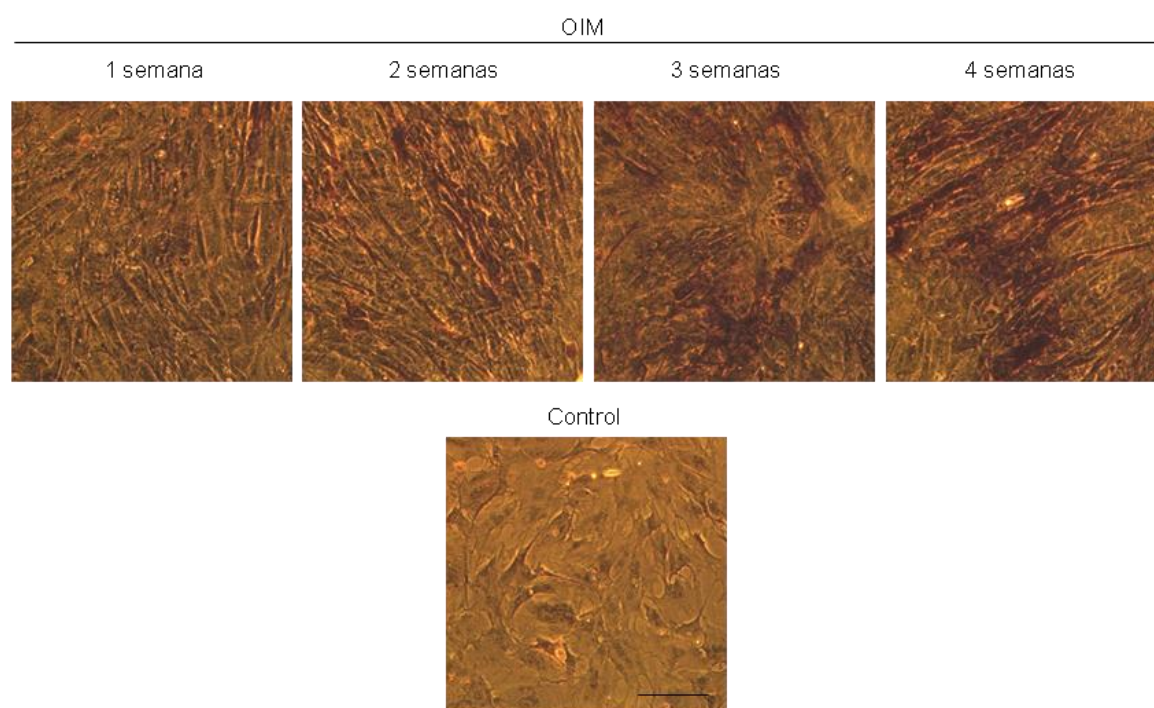




**Fig. 43. La 5-HT induce la acumulación nuclear de STAT1 en hMSCs en proceso de diferenciación adipogénica. (A)** Inmunocitoquímicas para STAT1, STAT3 y STAT5 en hMSCs cultivadas durante 3 semanas en AIM suplementado o no (control) con 5-HT  $\mu$ M, E2 40 nM, o una combinación de ambas hormonas. Los núcleos aparecen marcados con DAPI y las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. Barra de escala 50  $\mu$ m. **(B)** *Western-blot* para c-Fos de extractos nucleares de hMSCs estimuladas con 5-HT  $\mu$ M durante los tiempos indicados, previo ayuno de 24 horas. **(C)** Cuantificación de la señal de banda de los geles anteriores por densitometría.

### 3. La síntesis de serotonina en hMSCs regula negativamente su diferenciación osteoblástica

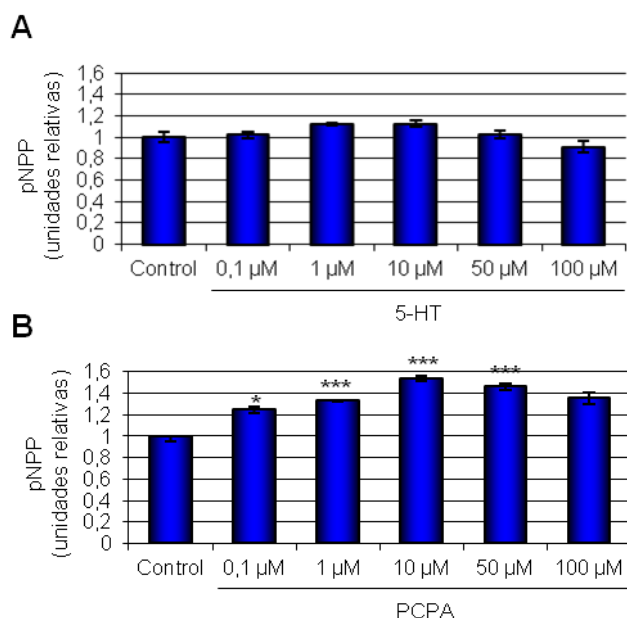
En la introducción exponíamos como los trabajos de la última década han establecido la existencia de un control serotoninérgico de la masa ósea. Se ha demostrado como la 5-HT, dependiendo del sitio de síntesis, tiene efectos positivos o negativos sobre la formación ósea. Así, la 5-HT sintetizada en las células enterocromafines del intestino, vía torrente sanguíneo, disminuye directamente la proliferación de osteoblastos a través del receptor 5-HT<sub>1B</sub>. Por otra parte, la 5-HT sintetizada por las neuronas serotoninérgicas en el rafe dorsal disminuye el tono simpático, lo que últimamente lleva a una mayor proliferación de osteoblastos y una menor diferenciación de osteoclastos, condicionando en suma una mayor formación ósea acompañada de una menor resorción y, por tanto, un fenotipo de alta masa ósea.



**Fig. 44. Diferenciación osteoblástica de hMSCs.** Actividad fosfatasa alcalina, detectada con NBT, durante la diferenciación osteoblástica de hMSCs inducida mediante cultivo en medio inductor de diferenciación osteoblástica (OIM). Se muestran imágenes representativas de estos cultivos en los tiempos indicados. Como control mostramos hMSCs cultivadas en medio de crecimiento. Barra de escala 100  $\mu$ m.

Habiendo detectado una mayor diferenciación adipocítica de hMSCs en respuesta a 5-HT, estudiamos la implicación de la 5-HT en la diferenciación osteoblástica de estas células. Para ello, primeramente comprobamos la correcta diferenciación de las hMSCs mediante cultivo en medio de inducción osteoblástico (OIM). Con este propósito, las células se mantuvieron en

OIM durante cuatro semanas y la diferenciación osteoblástica se detectó visualizando la actividad fosfatasa alcalina (característica de osteoblastos) mediante NBT (ver *Materiales y Métodos*) en los tiempos indicados (Fig. 44). Mostramos imágenes representativas de estos cultivos, en las que se aprecia el incremento en la expresión de proteína fosfatasa alcalina según progresa la diferenciación osteoblástica.

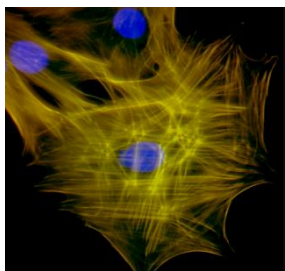


**Fig. 45.** Cuantificación de la actividad fosfatasa alcalina mediante pNPP en cultivos de hMSCs mantenidos durante 3 semanas en OIM suplementado o no (control) con concentraciones crecientes de 5-HT (**A**) o PCPA (**B**). Se muestra la media de tres experimentos independientes.

Una vez comprobado el potencial osteogénico de nuestros cultivos de hMSCs, analizamos si éste se veía alterado al suplementar el medio inductor con 5-HT. Para ello mantuvimos las células en OIM suplementado con concentraciones crecientes de 5-HT (0,1-100 μM) durante cuatro semanas y cuantificamos la actividad fosfatasa alcalina con pNPP tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Como se observa en la Fig. 45A, la adición de 5-HT al medio osteogénico no alteró la diferenciación de las hMSCs. Sin embargo, cuando realizamos este ensayo cultivando las células en OIM suplementado con concentraciones

crecientes (0,1-100 μM) de PCPA (inhibidor de Tph), encontramos un incremento notable en la diferenciación de osteoblastos dependiente de la concentración de PCPA (Fig. 45B). Estos resultados indican un papel para la actividad de Tph-1 durante la diferenciación osteoblástica de hMSCs, y sugieren que esta síntesis endógena de 5-HT podría tener un efecto inhibitorio sobre la diferenciación de hMSCs a osteoblastos.





## *Discusión*



En los últimos años el conocimiento de la fisiología del esqueleto de los vertebrados ha experimentado una auténtica revolución. Con el descubrimiento de la función fundamental de la osteocalcina ósea sobre la producción y respuesta a insulina en el organismo (Karsenty and Ferron, 2012), el esqueleto se ha identificado como un órgano endocrino principal en la regulación de la homeostasis de la glucosa y el gasto energético de los vertebrados. Dada la alta prevalencia de enfermedades degenerativas como osteoporosis, obesidad y diabetes en la sociedad actual, la consideración del tejido óseo como regulador del metabolismo energético del organismo abre un campo hasta ahora desconocido para el estudio de nuevas alternativas terapéuticas. En este contexto, los medicamentos que actúan sobre el sistema de señalización de serotonina, como los SSRIs y los SGAs, han suscitado un especial interés (Rizzoli R., 2012). La complejidad la función de la serotonina como regulador de la fisiología ósea está empezando a ser explicada ahora que conocemos su papel determinante en la adquisición de masa ósea. Se ha descrito un nuevo eje endocrino consistente en tejido adiposo (leptina)-SNC (serotonina)-hueso (osteocalcina) fundamental en la regulación del metabolismo energético y en el que la síntesis de serotonina en el SNC juega un papel esencial como estimulador de la formación ósea (Karsenty G., 2010; Motyl KJ., 2012). Por otra parte, la serotonina circulante procedente del intestino delgado regula negativamente la adquisición de masa ósea actuando directamente sobre los osteoblastos (Yadav et al., 2008). La serotonina se desvela así como un regulador clave de la remodelación ósea actuando tanto indirecta como directamente sobre las células del tejido óseo. Ahora es necesario explorar en profundidad como actúa la serotonina sobre las distintas células del nicho de la médula ósea responsables del proceso de remodelación ósea, con el fin de conocer las implicaciones de la señalización serotoninérgica en la fisiología del esqueleto y entender su papel en la integración del tejido óseo en el sistema endocrino del organismo. En el presente trabajo analizamos la acción de la serotonina en cultivos primarios de hMSCs, células precursoras de los osteoblastos y adipocitos que integran la médula ósea en el organismo adulto, con el fin de aportar datos que ayuden al mejor conocimiento del nicho óseo.

Nuestros resultados indican que la serotonina puede actuar como un estimulador de la diferenciación adipocítica de las hMSCs medulares. Se ha demostrado que la serotonina es un factor necesario para la adipogénesis de las células murinas 3T3-L1, estimulando su diferenciación adipocítica a través de la activación de los receptores 5-HT2A y 5-HT2C (Kinoshita et al.). En concordancia, nuestros resultados indican que el estímulo serotoninérgico de la adipogénesis en hMSCs es mediado fundamentalmente por la acción del receptor 5-HT2A. Además, el receptor 5-HT2B puede a su vez regular negativamente la acción proadipogénica de la serotonina. En apoyo de este resultado, un *screening* reciente con ARNi

ha identificado al receptor 5-HT2B como uno de los principales genes implicados en la diferenciación de adipocitos humanos, habiéndose demostrado además que la disminución de la actividad de 5-HT2B incrementa la diferenciación de estos preadipocitos (Jörn Söhle, 2012). Nuestros datos muestran también que tanto las hMSCs como los adipocitos derivados de éstas expresan el receptor 5-HT1B y el transportador específico 5-HTT. Mientras que la actividad de 5-HT1B no parece intervenir en la respuesta proadipogénica de las hMSCs a serotonina, nuestros resultados indican que la inhibición del 5-HTT limita esta respuesta.

Nuestros análisis indican que tanto las hMSCs como los adipocitos derivados expresan el enzima Tph-1 para la síntesis de serotonina. Ya se ha sugerido que la serotonina sintetizada localmente por las células de la médula ósea puede ser un componente integral del nicho medular, pues estimula tanto *in vitro* como *in vivo* la diferenciación osteoclástica de los monocitos/macrófagos medulares vía un eje autocrino/paracrino (Chabbi-Achengli Y., 2012). También se ha descrito la expresión de Tph-1 en osteoblastos murinos (Gustafsson BI., 2006), aunque aún no se ha descrito si estas células sintetizan serotonina. Nuestros resultados sugieren que las MSCs/preosteoblastos sintetizan serotonina durante su diferenciación osteoblástica y que esta síntesis regula el proceso de diferenciación, pues la inhibición específica de la actividad Tph conduce a un incremento significativo en la osteoblastogénesis. Por el contrario, la diferenciación adipocítica de las hMSCs, que se incrementa en respuesta al aporte exógeno de serotonina, no se ve alterada al inhibir la actividad de Tph. Esto indica que la síntesis de serotonina en las MSCs/preadipocitos no es un evento crítico en su diferenciación adipocítica. Puesto que estos adipocitos pueden modular el microambiente medular con la secreción de factores paracrinos y garantizando el aporte energético necesario para el proceso de remodelación ósea (Ducy; Gimble et al., 2006), la serotonina podría estar regulando de esta manera la homeostasia energética en la médula ósea adulta, lo que encaja con el papel de la serotonina como regulador esencial del metabolismo energético del organismo.

### Señalización serotoninérgica en hMSCs. Envejecimiento

La disminución de masa ósea durante el envejecimiento se caracteriza por una pérdida de las trabéculas óseas, con el consiguiente aumento en la porosidad del tejido acompañado de un incremento en el espacio medular de los huesos largos. Así, de una manera progresiva se modifica la matriz extracelular y sus propiedades físico-químicas dando lugar a un nicho diferente, donde se favorece la diferenciación de las células progenitoras en



adipocitos. De hecho, se ha demostrado que la célula MSC adquiere su determinación celular osteo/adipogénica en cultivos 3D en respuesta a cambios en la rigidez/elasticidad de la matriz extracelular (Khetan S., 2013). Estos resultados indican el inmenso desconocimiento de los procesos de formación y mantenimiento del esqueleto.

Nuestros resultados muestran una implicación de la señalización ROS tanto en la acción proadipogénica de la serotonina como en la inducción de adipogénesis con el cóctel de inductores habitual. El estrés oxidativo juega un importante papel en las distintas alteraciones que caracterizan al envejecimiento del organismo, entre ellas la pérdida ósea y el aumento en la adipogénesis medular (Almeida M., 2013). Se ha demostrado que en las MSCs, la señal ROS producto de la actividad NAD(P)H oxidasa estimula su diferenciación a adipocitos (Kanda Y., 2011; Lee et al., 2009). Nuestros resultados muestran que en las hMSCs la serotonina induce la activación de la quinasa ERK1/2 a través de su receptor 5-HT2A de una manera dependiente tanto de la señalización ROS como de la actividad NAD(P)H oxidasa. En concordancia, la activación de la proteína c-Fos en respuesta a serotonina, previa fosforilación de ERK1/2, es mediada a través del receptor 5-HT2A y la activación de NAD(P)H oxidasa. Por tanto, nuestros resultados sugieren un mecanismo de señalización para el receptor 5-HT2A en hMSCs que implica la activación de la ruta NAD(P)H oxidasa → ROS → ERK1/2. Puesto que los datos indican que la acción proadipogénica de la serotonina es mediada por el receptor 5-HT2A, así como que esta acción implica la generación de ROS y la activación de la proteína c-Fos, este mecanismo de señalización debe estar implicado en el efecto proadipogénico de la serotonina en los cultivos de hMSCs.

Junto con las ROS, los factores de transcripción FoxO son reguladores fundamentales de la homeostasis esquelética y están directamente implicados en el envejecimiento del tejido óseo (Manolagas SC., 2010; Kousteni S., 2011; Almeida M., 2012). Nuestros datos muestran una activación de ROS y FoxO durante la adipogénesis de hMSCs, así como que la señalización serotoninérgica estimula tanto la producción de ROS como la activación de factores FoxO en estas células, tanto en condiciones de crecimiento como durante su programa de diferenciación adipocítica. Precisamente, se ha demostrado *in vivo* que la disminución en la proliferación de osteoblastos en respuesta a altos niveles de serotonina circulante depende de la activación de FoxO1 por 5-HT en estas células (Kode A., 2012). Por tanto, la señalización FoxO podría estar implicada en distintas acciones de la serotonina en el nicho medular. Dada la importancia de ROS y FoxO en el cambio en el ratio osteoblasto/adipocito que caracteriza al envejecimiento del esqueleto, conocer los factores

que dirigen la señalización ROS/FoxO en estas células y sus precursores resulta fundamental para el estudio del desarrollo de osteoporosis relacionado con la edad. Se ha sugerido que, como hacen en otros tejidos, los factores FoxO pueden actuar en la médula ósea preservando la integridad y la homeostasis del *pool* de MSCs. En este contexto, nuestros datos muestran que la serotonina incrementa la supervivencia celular en los cultivos adipogénicos de hMSCs de una manera dependiente de su concentración. Esta acción de la serotonina ya ha sido descrita en cultivos de cardiomiocitos, donde previene la apoptosis a través de la activación de su receptor 5-HT2B (Nebigil CG., 2003). La inhibición específica de este receptor *in vivo* disminuye notablemente la apoptosis de los cardiomiocitos (Bai CF., 2010). En concordancia con estos datos, nuestros resultados muestran que la inhibición del receptor 5-HT2B conduce a un incremento significativo en la viabilidad celular de los cultivos de hMSCs inducidos con medio adipogénico a largo plazo. Aunque es necesario un análisis en profundidad, los datos sugieren que la acción de la serotonina sobre los factores FoxO durante la diferenciación adipogénica podría estar implicada en el incremento en la viabilidad celular observado.

Distintos trabajos indican que los efectos negativos en el esqueleto del estrés oxidativo asociado a la edad pueden deberse a una disminución en la transcripción mediada por  $\beta$ -catenina/TCF consecuencia precisamente de la activación de factores FoxO por ROS (Manolagas SC., 2007; Galli C., 2011; Almeida M., 2011). Aunque sólo contamos con experimentos de inmunocitoquímica nuestros resultados indican que la serotonina, además de activar la señalización ROS/FoxO, puede alterar la función de  $\beta$ -catenina durante la adipogénesis de hMSCs, promoviendo su localización en las uniones intercelulares en las primeras etapas y disminuyendo su concentración citoplasmática en las fases más tardías. Por tanto, aún siendo preliminares, nuestros datos concuerdan con los trabajos que muestran una disminuida acción transcripcional de  $\beta$ -catenina durante la diferenciación adipocítica de MSCs en la médula ósea (Ross SE., 2000; Bennett CN., 2002; Kennell JA., 2005; Sang YZ., 2007; Sen B., 2008; Naito M., 2012; Song L., 2012; Georgiou KR., 2012; Cawthorn WP., 2012) e indican que la 5-HT puede alterar los niveles de  $\beta$ -catenina citoplasmática en estas células.

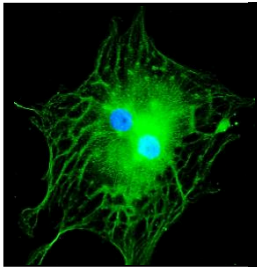
### *Implicación del estradiol en la señalización serotoninérgica en hMSCs*

La disminución en la masa ósea que caracteriza a la bajada en los niveles de estradiol circulantes tras la menopausia, igual que la asociada al envejecimiento, se acompaña de un cambio en el ratio adipocito/osteoblasto que favorece la producción de tejido graso en la

médula ósea (Gambacciani 1997; Justesen 2001). Sin embargo, nuestros resultados muestran un claro efecto proadipogénico del estradiol cuando es utilizado como suplemento del medio de inducción adipogénica en los cultivos de hMSCs. Esto concuerda con otro trabajo que muestra un incremento en la diferenciación adipocítica de las hMSCs en respuesta a estradiol (Hong L., 2006), aunque también se ha indicado que el E2 puede reprimir la adipogénesis en estas células (Heim M., 2004). Estas discrepancias sobre el papel de los estrógenos en la diferenciación de hMSCs podrían estar relacionadas con las diferencias en los cócteles de inducción adipogénica utilizados en cada caso. Esto pone de manifiesto la importancia de encontrar la modulación óptima de factores empleados para estimular el desarrollo del tejido *in vitro* a la hora de garantizar la eficacia de la utilización de cultivos de MSCs en terapia celular (Ohgushi H, 1999; Chen J, 2005; Mendes SC, 2004; Sikavitsas VI, 2003). En este contexto nuestros datos muestran que, mientras que tanto la 5-HT como el E2 estimulan significativamente la adipogénesis en los cultivos de hMSCs, la acción combinada de ambas hormonas conduce a valores de diferenciación adipogénica próximos al control. Por tanto, la presencia o no de E2 en el cóctel de inducción adipogénica condiciona la respuesta de las hMSCs al estímulo serotoninérgico, y viceversa. Además, nuestros resultados indican también una relación entre las señalizaciones de 5-HT y E2 que dirige la acción de ambas hormonas sobre la proliferación de las hMSCs. Mientras que la acción individual de la serotonina y el estradiol no altera de manera significativa la proliferación de las hMSCs, el estímulo combinado con ambas hormonas incrementa notablemente la proliferación celular en el cultivo. Analizamos qué mecanismos de señalización activados por la 5-HT en hMSCs se ven alterados en células cultivadas en presencia de estrógenos. Se ha descrito que la señalización de estrógenos puede dirigir acciones opuestas al estrés oxidativo en las MSCs, promoviendo la transcripción mediada por  $\beta$ -catenina/TCF, disminuyendo la transcripción  $\beta$ -catenina/FoxO e inhibiendo la diferenciación adipocítica. De hecho, se ha sugerido que el incremento en ROS asociado al envejecimiento media los efectos esqueléticos de los bajos niveles de estrógenos tras la menopausia. Sin embargo, nuestros estudios inmunocitoquímicos de  $\beta$ -catenina no muestran una activación de la proteína en respuesta a estradiol en los cultivos adipogénicos de hMSCs. Además, nuestros resultados muestran que la presencia de estrógenos no altera la activación de factores FoxO por 5-HT durante la adipogénesis de hMSCs. En concordancia, el incremento en la viabilidad celular de estos cultivos en respuesta a serotonina no se modifica por la acción del estradiol. Por lo tanto, los resultados aquí presentados indican que las acciones de los estrógenos estudiadas en las hMSCs no implican cambios en la transcripción mediada por  $\beta$ -catenina/FoxO.

Algunos estudios *in vivo* sugieren una implicación de los estrógenos en los efectos perjudiciales del uso de SSRIs en el esqueleto (Battaglini R., 2004; Warden S.J., 2008). Por otra parte, se ha demostrado que la inhibición de la síntesis duodenal de serotonina protege frente a la disminución en la masa ósea provocada por la ausencia de estrógenos (Yadav V.K., 2008). Por tanto, estos trabajos sugieren una interdependencia entre los niveles de estrógenos y serotonina que media las acciones de estas hormonas en la masa ósea. A estos datos nuestro trabajo añade la observación de esta relación en los cambios en proliferación y adipogénesis de las hMSCs en respuesta a la acción de estas hormonas, aunque no hemos logrado determinar los mecanismos responsables.

Nuestro trabajo sugiere que la serotonina puede actuar como un estimulador de la diferenciación adipocítica de las hMSCs en la médula ósea adulta y que los niveles de estrógenos deben cumplir un papel determinante en esta función serotoninérgica. Teniendo en cuenta que, además de regular la adipogénesis extramedular, la serotonina periférica ejerce un importante control sobre la homeostasis energética regulando la actividad de osteoblastos y osteoclastos, no parece extraño que la serotonina ejerza también un control sobre los adipocitos medulares y sus células precursoras. Así, la serotonina circulante, además de promover indirectamente la captación de glucosa disminuyendo los niveles de leptina, podría actuar directamente sobre las MSCs de la médula ósea promoviendo su diferenciación en adipocitos. De este modo la acción de la serotonina garantizaría el almacén energético en la médula, a la vez que disminuiría el gasto energético de la remodelación ósea al inhibir la proliferación de los osteoblastos. Por tanto, y teniendo en cuenta que sólo contamos con datos de experimentos *in vitro*, nuestros resultados encajan con los trabajos que en estos últimos años han revelado el papel fundamental que cumple la serotonina en la regulación coordinada de los metabolismos óseo y energético.



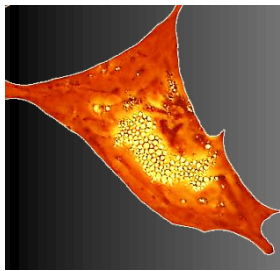
## *Conclusiones*



1. Las hMSCs y los adipocitos derivados en cultivo expresan el enzima Tph-1 para la síntesis de serotonina, el transportador específico 5-HTT y los receptores serotoninérgicos 5-HT1B, 5-HT2A y 5-HT2B.
2. El estímulo con serotonina induce la fosforilación de la quinasa ERK1/2 y la activación del factor de transcripción c-Fos a través de sus receptores 5-HT2A y 5-HT2B en las hMSCs. La activación de la señalización ERK1/2/c-Fos en respuesta a serotonina depende de la producción de ROS vía actividad NAD(P)H oxidasa. Esto sugiere un mecanismo de señalización para la 5-HT en las hMSCs consistente en 5-HT → 5-HT2A/B → NAD(P)H oxidasa → ROS → ERK1/2 → c-Fos.
3. La serotonina estimula la adipogénesis en hMSCs a través de su receptor 5-HT2A, y esta acción es negativamente regulada por la actividad del receptor 5-HT2B. La actividad Tph-1 en hMSCs regula negativamente su diferenciación osteoblástica.
4. La serotonina estimula la producción de ROS y la activación de los factores de transcripción FoxO en las hMSCs durante su programa de diferenciación adipogénica. La serotonina incrementa la viabilidad celular en los cultivos adipogénicos de hMSCs inducidos a largo plazo. La inhibición específica de la actividad 5-HT2B incrementa la viabilidad celular de estos cultivos.
5. Existe una interdependencia entre las acciones de la serotonina y el estradiol en los cultivos de hMSCs. La acción sinérgica de la serotonina y el estradiol estimula la proliferación de las hMSCs, mientras que regula negativamente la respuesta proadipogénica de las hMSCs a cada una de estas hormonas.







## ***Bibliografía***



- Ackerman, G.A. (1962). Substituted naphthol AS phosphate derivatives for the localization of leukocyte alkaline phosphatase activity. *Lab Invest* 11, 563-567.
- Akune, T., Ohba, S., Kamekura, S., Yamaguchi, M., Chung, U.I., Kubota, N., Terauchi, Y., Harada, Y., Azuma, Y., Nakamura, K., *et al.* (2004). PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest* 113, 846-855.
- Alexander, J.S., Hechtman, H.B., and Shepro, D. (1987). Serotonin induced actin polymerization and association with cytoskeletal elements in cultured bovine aortic endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 143, 152-158.
- Alexander, S.P., Mathie, A., and Peters, J.A. (2008). Guide to Receptors and Channels (GRAC), 3rd edition. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 2, S1-209.
- Almeida, M., Han, L., Ambrogini, E., Weinstein, R.S., and Manolagas, S.C. Glucocorticoids and tumor necrosis factor alpha increase oxidative stress and suppress Wnt protein signaling in osteoblasts. *J Biol Chem* 286, 44326-44335.
- Almeida, M., Han, L., Martin-Millan, M., O'Brien, C.A., and Manolagas, S.C. (2007a). Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor- to forkhead box O-mediated transcription. *J Biol Chem* 282, 27298-27305.
- Almeida, M., Han, L., Martin-Millan, M., Plotkin, L.I., Stewart, S.A., Roberson, P.K., Kousteni, S., O'Brien, C.A., Bellido, T., Parfitt, A.M., *et al.* (2007b). Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. *J Biol Chem* 282, 27285-27297.
- Ambrogini, E., Almeida, M., Martin-Millan, M., Paik, J.H., Depinho, R.A., Han, L., Goellner, J., Weinstein, R.S., Jilka, R.L., O'Brien, C.A., *et al.* FoxO-mediated defense against oxidative stress in osteoblasts is indispensable for skeletal homeostasis in mice. *Cell Metab* 11, 136-146.
- Andreeva, E.R., Pugach, I.M., Gordon, D., and Orekhov, A.N. (1998). Continuous subendothelial network formed by pericyte-like cells in human vascular bed. *Tissue Cell* 30, 127-135.
- Aonuma, H., Miyakoshi, N., Hongo, M., Kasukawa, Y., and Shimada, Y. (2009). Low serum levels of undercarboxylated osteocalcin in postmenopausal osteoporotic women receiving an inhibitor of bone resorption. *Tohoku J Exp Med* 218, 201-205.
- Arden, K.C. (2008). FOXO animal models reveal a variety of diverse roles for FOXO transcription factors. *Oncogene* 27, 2345-2350.
- Azuma, K., Horie, K., Inoue, S., Ouchi, Y., and Sakai, R. (2004). Analysis of estrogen receptor alpha signaling complex at the plasma membrane. *FEBS Lett* 577, 339-344.
- Baksh, D., Yao, R., and Tuan, R.S. (2007). Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 25, 1384-1392.

- Balemans, W., Ebeling, M., Patel, N., Van Hul, E., Olson, P., Dioszegi, M., Lacza, C., Wuyts, W., Van Den Ende, J., Willems, P., *et al.* (2001). Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet* *10*, 537-543.
- Battaglini, R., Fu, J., Spate, U., Ersoy, U., Joe, M., Sedaghat, L., and Stashenko, P. (2004). Serotonin regulates osteoclast differentiation through its transporter. *J Bone Miner Res* *19*, 1420-1431.
- Belaid-Choucair, Z., Lepelletier, Y., Poncin, G., Thiry, A., Humblet, C., Maachi, M., Beaulieu, A., Schneider, E., Briquet, A., Mineur, P., *et al.* (2008). Human bone marrow adipocytes block granulopoiesis through neuropilin-1-induced granulocyte colony-stimulating factor inhibition. *Stem Cells* *26*, 1556-1564.
- Belin de Chantemele, E., Blanc, S., Pellet, N., Duvareille, M., Ferretti, G., Gauquelin-Koch, G., Gharib, C., and Custaud, M.A. (2004). Does resistance exercise prevent body fluid changes after a 90-day bed rest? *Eur J Appl Physiol* *92*, 555-564.
- Bellido, T., Girasole, G., Passeri, G., Yu, X.P., Mocharla, H., Jilka, R.L., Notides, A., and Manolagas, S.C. (1993). Demonstration of estrogen and vitamin D receptors in bone marrow-derived stromal cells: up-regulation of the estrogen receptor by 1,25-dihydroxyvitamin-D3. *Endocrinology* *133*, 553-562.
- Bertrand, P.P., Paravavitane, U.T., Chavez, C., Gogos, A., Jones, M., and van den Buuse, M. (2005). The effect of low estrogen state on serotonin transporter function in mouse hippocampus: a behavioral and electrochemical study. *Brain Res* *1064*, 10-20.
- Bianco, P., Robey, P.G., and Simmons, P.J. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* *2*, 313-319.
- Bianchi, M., Shah, A.J., Fone, K.C., Atkins, A.R., Dawson, L.A., Heidbreder, C.A., Hows, M.E., Hagan, J.J., and Marsden, C.A. (2009). Fluoxetine administration modulates the cytoskeletal microtubular system in the rat hippocampus. *Synapse* *63*, 359-364.
- Bianchi, P., Kunduzova, O., Masini, E., Cambon, C., Bani, D., Raimondi, L., Seguelas, M.H., Nistri, S., Colucci, W., Leducq, N., *et al.* (2005a). Oxidative stress by monoamine oxidase mediates receptor-independent cardiomyocyte apoptosis by serotonin and postischemic myocardial injury. *Circulation* *112*, 3297-3305.
- Bianchi, P., Pimentel, D.R., Murphy, M.P., Colucci, W.S., and Parini, A. (2005b). A new hypertrophic mechanism of serotonin in cardiac myocytes: receptor-independent ROS generation. *FASEB J* *19*, 641-643.
- Blizotes, M., Eshleman, A., Burt-Pichat, B., Zhang, X.W., Hashimoto, J., Wiren, K., and Chenu, C. (2006). Serotonin transporter and receptor expression in osteocytic MLO-Y4 cells. *Bone* *39*, 1313-1321.
- Blizotes, M.M., Eshleman, A.J., Zhang, X.W., and Wiren, K.M. (2001). Neurotransmitter action in osteoblasts: expression of a functional system for serotonin receptor activation and reuptake. *Bone* *29*, 477-486.

- Bodine, P.V., Zhao, W., Kharode, Y.P., Bex, F.J., Lambert, A.J., Goad, M.B., Gaur, T., Stein, G.S., Lian, J.B., and Komm, B.S. (2004). The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice. *Mol Endocrinol* 18, 1222-1237.
- Bolton, J.M., Metge, C., Lix, L., Prior, H., Sareen, J., and Leslie, W.D. (2008). Fracture risk from psychotropic medications: a population-based analysis. *J Clin Psychopharmacol* 28, 384-391.
- Boyden, L.M., Mao, J., Belsky, J., Mitzner, L., Farhi, A., Mitnick, M.A., Wu, D., Insogna, K., and Lifton, R.P. (2002). High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 346, 1513-1521.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bruno, S., Bussolati, B., Grange, C., Collino, F., di Cantogno, L.V., Herrera, M.B., Biancone, L., Tetta, C., Segoloni, G., and Camussi, G. (2009). Isolation and characterization of resident mesenchymal stem cells in human glomeruli. *Stem Cells Dev* 18, 867-880.
- Burkhardt, R., Kettner, G., Bohm, W., Schmidmeier, M., Schlag, R., Frisch, B., Mallmann, B., Eisenmenger, W., and Gilg, T. (1987). Changes in trabecular bone, hematopoiesis and bone marrow vessels in aplastic anemia, primary osteoporosis, and old age: a comparative histomorphometric study. *Bone* 8, 157-164.
- Cadigan, K.M., and Peifer, M. (2009). Wnt signaling from development to disease: insights from model systems. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a002881.
- Calarge, C.A., Zimmerman, B., Xie, D., Kuperman, S., and Schlechte, J.A. A cross-sectional evaluation of the effect of risperidone and selective serotonin reuptake inhibitors on bone mineral density in boys. *J Clin Psychiatry* 71, 338-347.
- Calnan, D.R., and Brunet, A. (2008). The FoxO code. *Oncogene* 27, 2276-2288.
- Campagnoli, C., Roberts, I.A., Kumar, S., Bennett, P.R., Bellantuono, I., and Fisk, N.M. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98, 2396-2402.
- Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9, 641-650.
- Caplan, A.I., and Correa, D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell* 9, 11-15.
- Caplan, A.I., and Dennis, J.E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 98, 1076-1084.
- Carcamo-Orive, I., Gaztelumendi, A., Delgado, J., Tejedós, N., Dorronsoro, A., Fernández-Rueda, J., Pennington, D.J., and Trigueros, C. Regulation of human bone marrow stromal cell proliferation and differentiation capacity by glucocorticoid receptor and AP-1 crosstalk. *J Bone Miner Res* 25, 2115-2125.
- Carmeci, C., Thompson, D.A., Ring, H.Z., Francke, U., and Weigel, R.J. (1997). Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics* 45, 607-617.

- Cartwright, M.J., Tchkonja, T., and Kirkland, J.L. (2007). Aging in adipocytes: potential impact of inherent, depot-specific mechanisms. *Exp Gerontol* **42**, 463-471.
- Castellone, M.D., Teramoto, H., Williams, B.O., Druey, K.M., and Gutkind, J.S. (2005). Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science* **310**, 1504-1510.
- Castoria, G., Barone, M.V., Di Domenico, M., Bilancio, A., Ametrano, D., Migliaccio, A., and Auricchio, F. (1999). Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis. *EMBO J* **18**, 2500-2510.
- Castro-Malaspina, H., Gay, R.E., Resnick, G., Kapoor, N., Meyers, P., Chiarieri, D., McKenzie, S., Broxmeyer, H.E., and Moore, M.A. (1980). Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* **56**, 289-301.
- Cawthorn, W.P., Bree, A.J., Yao, Y., Du, B., Hemati, N., Martinez-Santibanez, G., and MacDougald, O.A. Wnt6, Wnt10a and Wnt10b inhibit adipogenesis and stimulate osteoblastogenesis through a beta-catenin-dependent mechanism. *Bone* **50**, 477-489.
- Cohen, A., Recker, R.R., Lappe, J., Dempster, D.W., Cremers, S., McMahon, D.J., Stein, E.M., Fleischer, J., Rosen, C.J., Rogers, H., *et al.* Premenopausal women with idiopathic low-trauma fractures and/or low bone mineral density. *Osteoporos Int* **23**, 171-182.
- Colas, J.F., Launay, J.M., Vonesch, J.L., Hickel, P., and Maroteaux, L. (1999). Serotonin synchronises convergent extension of ectoderm with morphogenetic gastrulation movements in *Drosophila*. *Mech Dev* **87**, 77-91.
- Collet, C., Schiltz, C., Geoffroy, V., Maroteaux, L., Launay, J.M., and de Vernejoul, M.C. (2008). The serotonin 5-HT<sub>2B</sub> receptor controls bone mass via osteoblast recruitment and proliferation. *FASEB J* **22**, 418-427.
- Compston, J. (2002). Local biosynthesis of sex steroids in bone. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 5398-5400.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., *et al.* (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* **3**, 301-313.
- Chabbi-Achengli, Y., Coudert, A.E., Callebert, J., Geoffroy, V., Cote, F., Collet, C., and de Vernejoul, M.C. Decreased osteoclastogenesis in serotonin-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 2567-2572.
- Chagin, A.S., and Savendahl, L. (2007). GPR30 estrogen receptor expression in the growth plate declines as puberty progresses. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 4873-4877.
- Chavez, C., Hollaus, M., Scarr, E., Pavey, G., Gogos, A., and van den Buuse, M. The effect of estrogen on dopamine and serotonin receptor and transporter levels in the brain: an autoradiography study. *Brain Res* **1321**, 51-59.
- Chen, F.P., Hu, C.H., and Wang, K.C. Estrogen modulates osteogenic activity and estrogen receptor mRNA in mesenchymal stem cells of women. *Climacteric*.

- Chen, Y., Teng, F.Y., and Tang, B.L. (2006). Coaxing bone marrow stromal mesenchymal stem cells towards neuronal differentiation: progress and uncertainties. *Cell Mol Life Sci* **63**, 1649-1657.
- Chen, Z., Yuhanna, I.S., Galcheva-Gargova, Z., Karas, R.H., Mendelsohn, M.E., and Shaul, P.W. (1999). Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* **103**, 401-406.
- De Bari, C., and Dell'accio, F. (2007). Mesenchymal stem cells in rheumatology: a regenerative approach to joint repair. *Clin Sci (Lond)* **113**, 339-348.
- De Bari, C., Dell'Accio, F., Karystinou, A., Guillot, P.V., Fisk, N.M., Jones, E.A., McGonagle, D., Khan, I.M., Archer, C.W., Mitsiadis, T.A., *et al.* (2008). A biomarker-based mathematical model to predict bone-forming potency of human synovial and periosteal mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* **58**, 240-250.
- De Bari, C., Dell'Accio, F., and Luyten, F.P. (2001a). Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum* **44**, 85-95.
- De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., and Luyten, F.P. (2001b). Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* **44**, 1928-1942.
- De Bari, C., Dell'Accio, F., Vandenabeele, F., Vermeesch, J.R., Raymackers, J.M., and Luyten, F.P. (2003). Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol* **160**, 909-918.
- De Bari, C., Dell'Accio, F., Vanlauwe, J., Eyckmans, J., Khan, I.M., Archer, C.W., Jones, E.A., McGonagle, D., Mitsiadis, T.A., Pitzalis, C., *et al.* (2006). Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum* **54**, 1209-1221.
- de Boer, J., Andressoo, J.O., de Wit, J., Huijmans, J., Beems, R.B., van Steeg, H., Weeda, G., van der Horst, G.T., van Leeuwen, W., Themmen, A.P., *et al.* (2002). Premature aging in mice deficient in DNA repair and transcription. *Science* **296**, 1276-1279.
- De Luca, A., Lamura, L., Gallo, M., Maffia, V., and Normanno, N. Mesenchymal stem cell-derived interleukin-6 and vascular endothelial growth factor promote breast cancer cell migration. *J Cell Biochem* **113**, 3363-3370.
- Derfoul, A., Perkins, G.L., Hall, D.J., and Tuan, R.S. (2006). Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells* **24**, 1487-1495.
- Devine, S.M., and Hoffman, R. (2000). Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* **7**, 358-363.
- Dhillon, H., Zigman, J.M., Ye, C., Lee, C.E., McGovern, R.A., Tang, V., Kenny, C.D., Christiansen, L.M., White, R.D., Edelstein, E.A., *et al.* (2006). Leptin directly activates SF1

neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron* **49**, 191-203.

- Diamond, M.I., Miner, J.N., Yoshinaga, S.K., and Yamamoto, K.R. (1990). Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science* **249**, 1266-1272.
- Diem, S.J., Blackwell, T.L., Stone, K.L., Yaffe, K., Haney, E.M., Bliziotes, M.M., and Ensrud, K.E. (2007). Use of antidepressants and rates of hip bone loss in older women: the study of osteoporotic fractures. *Arch Intern Med* **167**, 1240-1245.
- Dieudonne, M.N., Pecquery, R., Leneuve, M.C., and Giudicelli, Y. (2000). Opposite effects of androgens and estrogens on adipogenesis in rat preadipocytes: evidence for sex and site-related specificities and possible involvement of insulin-like growth factor 1 receptor and peroxisome proliferator-activated receptor gamma2. *Endocrinology* **141**, 649-656.
- DiMascio, L., Voermans, C., Uqoezwa, M., Duncan, A., Lu, D., Wu, J., Sankar, U., and Reya, T. (2007). Identification of adiponectin as a novel hemopoietic stem cell growth factor. *J Immunol* **178**, 3511-3520.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315-317.
- Douthwaite, G.P., Bishop, J.C., Redman, S.N., Khan, I.M., Rooney, P., Evans, D.J., Haughton, L., Bayram, Z., Boyer, S., Thomson, B., *et al.* (2004). The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci* **117**, 889-897.
- Ducy, P. The role of osteocalcin in the endocrine cross-talk between bone remodelling and energy metabolism. *Diabetologia* **54**, 1291-1297.
- Ducy, P., Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, A.F., Beil, F.T., Shen, J., Vinson, C., Rueger, J.M., and Karsenty, G. (2000). Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* **100**, 197-207.
- Dunning, A.M., Healey, C.S., Baynes, C., Maia, A.T., Scollen, S., Vega, A., Rodriguez, R., Barbosa-Morais, N.L., Ponder, B.A., Low, Y.L., *et al.* (2009). Association of ESR1 gene tagging SNPs with breast cancer risk. *Hum Mol Genet* **18**, 1131-1139.
- Eaves, C.J., Sutherland, H.J., Cashman, J.D., Otsuka, T., Lansdorp, P.M., Humphries, R.K., Eaves, A.C., and Hogge, D.E. (1991). Regulation of primitive human hematopoietic cells in long-term marrow culture. *Semin Hematol* **28**, 126-131.
- Endoh, H., Sasaki, H., Maruyama, K., Takeyama, K., Waga, I., Shimizu, T., Kato, S., and Kawashima, H. (1997). Rapid activation of MAP kinase by estrogen in the bone cell line. *Biochem Biophys Res Commun* **235**, 99-102.
- Erices, A., Conget, P., and Minguell, J.J. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* **109**, 235-242.



- Essers, M.A., de Vries-Smits, L.M., Barker, N., Polderman, P.E., Burgering, B.M., and Korswagen, H.C. (2005). Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science* *308*, 1181-1184.
- Feng, Y., and Gregor, P. (1997). Cloning of a novel member of the G protein-coupled receptor family related to peptide receptors. *Biochem Biophys Res Commun* *231*, 651-654.
- Fernandez-Real, J.M., Izquierdo, M., Ortega, F., Gorostiaga, E., Gomez-Ambrosi, J., Moreno-Navarrete, J.M., Fruhbeck, G., Martinez, C., Idoate, F., Salvador, J., *et al.* (2009). The relationship of serum osteocalcin concentration to insulin secretion, sensitivity, and disposal with hypocaloric diet and resistance training. *J Clin Endocrinol Metab* *94*, 237-245.
- Ferron, M., Wei, J., Yoshizawa, T., Del Fattore, A., DePinho, R.A., Teti, A., Ducy, P., and Karsenty, G. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell* *142*, 296-308.
- Fiorelli, G., Gori, F., Petilli, M., Tanini, A., Benvenuti, S., Serio, M., Bernabei, P., and Brandi, M.L. (1995). Functional estrogen receptors in a human preosteoclastic cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 2672-2676.
- Forsen, L., Meyer, H.E., Midthjell, K., and Edna, T.H. (1999). Diabetes mellitus and the incidence of hip fracture: results from the Nord-Trondelag Health Survey. *Diabetologia* *42*, 920-925.
- Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., and Lalykina, K.S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* *3*, 393-403.
- Fuller, R.W., and Wong, D.T. (1990). Serotonin uptake and serotonin uptake inhibition. *Ann N Y Acad Sci* *600*, 68-78; discussion 79-80.
- Furness, J.B., and Costa, M. (1982). Neurons with 5-hydroxytryptamine-like immunoreactivity in the enteric nervous system: their projections in the guinea-pig small intestine. *Neuroscience* *7*, 341-349.
- Gambacciani, M., Ciaponi, M., Cappagli, B., Piaggese, L., De Simone, L., Orlandi, R., and Genazzani, A.R. (1997). Body weight, body fat distribution, and hormonal replacement therapy in early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* *82*, 414-417.
- Gimble, J.M. (1990). The function of adipocytes in the bone marrow stroma. *New Biol* *2*, 304-312.
- Gimble, J.M., Robinson, C.E., Wu, X., and Kelly, K.A. (1996). The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone* *19*, 421-428.
- Gimble, J.M., Zvonic, S., Floyd, Z.E., Kassem, M., and Nuttall, M.E. (2006). Playing with bone and fat. *J Cell Biochem* *98*, 251-266.
- Gindraux, F., Selmani, Z., Obert, L., Davani, S., Tiberghien, P., Herve, P., and Deschaseaux, F. (2007). Human and rodent bone marrow mesenchymal stem cells that express primitive stem cell markers can be directly enriched by using the CD49a molecule. *Cell Tissue Res* *327*, 471-483.

- Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., and Pelicci, P.G. (2007). Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 722-728.
- Glass, D.A., 2nd, Bialek, P., Ahn, J.D., Starbuck, M., Patel, M.S., Clevers, H., Taketo, M.M., Long, F., McMahon, A.P., Lang, R.A., *et al.* (2005). Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* **8**, 751-764.
- Gong, Y., Slee, R.B., Fukai, N., Rawadi, G., Roman-Roman, S., Reginato, A.M., Wang, H., Cundy, T., Glorieux, F.H., Lev, D., *et al.* (2001). LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* **107**, 513-523.
- Green, A.R., and Curzon, G. (1968). Decrease of 5-hydroxytryptamine in the brain provoked by hydrocortisone and its prevention by allopurinol. *Nature* **220**, 1095-1097.
- Greer, E.L., and Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* **24**, 7410-7425.
- Grey, A., Bolland, M., Gamble, G., Wattie, D., Horne, A., Davidson, J., and Reid, I.R. (2007). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone decreases bone formation and bone mineral density in healthy postmenopausal women: a randomized, controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 1305-1310.
- Grigoriadis, A.E., Schellander, K., Wang, Z.Q., and Wagner, E.F. (1993). Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *J Cell Biol* **122**, 685-701.
- Grigoriadis, A.E., Wang, Z.Q., Cecchini, M.G., Hofstetter, W., Felix, R., Fleisch, H.A., and Wagner, E.F. (1994). c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* **266**, 443-448.
- Grunder, G., Hippus, H., and Carlsson, A. (2009). The 'atypicality' of antipsychotics: a concept re-examined and re-defined. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 197-202.
- Guo, Z., Li, H., Li, X., Yu, X., Wang, H., Tang, P., and Mao, N. (2006). In vitro characteristics and in vivo immunosuppressive activity of compact bone-derived murine mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells* **24**, 992-1000.
- Gustafsson, B.I., Thommesen, L., Stunes, A.K., Tommeras, K., Westbroek, I., Waldum, H.L., Slordahl, K., Tamburstuen, M.V., Reseland, J.E., and Syversen, U. (2006). Serotonin and fluoxetine modulate bone cell function in vitro. *J Cell Biochem* **98**, 139-151.
- Haczynski, J., Tarkowski, R., Jarzabek, K., Slomczynska, M., Wolczynski, S., Magoffin, D.A., Jakowicki, J.A., and Jakimiuk, A.J. (2002). Human cultured skin fibroblasts express estrogen receptor alpha and beta. *Int J Mol Med* **10**, 149-153.
- Haq, S., Michael, A., Andreucci, M., Bhattacharya, K., Dotto, P., Walters, B., Woodgett, J., Kilter, H., and Force, T. (2003). Stabilization of beta-catenin by a Wnt-independent mechanism regulates cardiomyocyte growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4610-4615.
- Harada, S., and Rodan, G.A. (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* **423**, 349-355.

- Haynesworth, S.E., Goshima, J., Goldberg, V.M., and Caplan, A.I. (1992). Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13, 81-88.
- Heim, M., Frank, O., Kampmann, G., Sochocky, N., Pennimpede, T., Fuchs, P., Hunziker, W., Weber, P., Martin, I., and Bendik, I. (2004). The phytoestrogen genistein enhances osteogenesis and represses adipogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells. *Endocrinology* 145, 848-859.
- Heino, T.J., Chagin, A.S., and Savendahl, L. (2008). The novel estrogen receptor G-protein-coupled receptor 30 is expressed in human bone. *J Endocrinol* 197, R1-6.
- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Strom, A., Treuter, E., Warner, M., *et al.* (2007). Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 87, 905-931.
- Hirai, T., Kaneshige, K., Kurosaki, T., and Nishio, H. Functional expression of 5-HT<sub>2A</sub> receptor in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 396, 278-282.
- Hirai, T., Tokumo, K., Tsuchiya, D., and Nishio, H. (2009). Expression of mRNA for 5-HT<sub>2</sub> receptors and proteins related to inactivation of 5-HT in mouse osteoblasts. *J Pharmacol Sci* 109, 319-323.
- Hong, L., Colpan, A., and Peptan, I.A. (2006). Modulations of 17-beta estradiol on osteogenic and adipogenic differentiations of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 12, 2747-2753.
- Hong, L., Zhang, G., Sultana, H., Yu, Y., and Wei, Z. The effects of 17-beta estradiol on enhancing proliferation of human bone marrow mesenchymal stromal cells in vitro. *Stem Cells Dev* 20, 925-931.
- Hong, S.H., Nah, H.Y., Lee, Y.J., Lee, J.W., Park, J.H., Kim, S.J., Lee, J.B., Yoon, H.S., and Kim, C.H. (2004). Expression of estrogen receptor-alpha and -beta, glucocorticoid receptor, and progesterone receptor genes in human embryonic stem cells and embryoid bodies. *Mol Cells* 18, 320-325.
- Hoogeboom, D., and Burgering, B.M. (2009). Should I stay or should I go: beta-catenin decides under stress. *Biochim Biophys Acta* 1796, 63-74.
- Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S., and Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393-395.
- Howard, L., Kirkwood, G., and Leese, M. (2007). Risk of hip fracture in patients with a history of schizophrenia. *Br J Psychiatry* 190, 129-134.
- Hoyer, D., Hannon, J.P., and Martin, G.R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71, 533-554.
- Hoyland, J.A., Mee, A.P., Baird, P., Braidman, I.P., Mawer, E.B., and Freemont, A.J. (1997). Demonstration of estrogen receptor mRNA in bone using in situ reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *Bone* 20, 87-92.
- Huang, H., and Manton, K.G. (2004). The role of oxidative damage in mitochondria during aging: a review. *Front Biosci* 9, 1100-1117.

- Hwang, Y.C., Jeong, I.K., Ahn, K.J., and Chung, H.Y. (2009). The uncarboxylated form of osteocalcin is associated with improved glucose tolerance and enhanced beta-cell function in middle-aged male subjects. *Diabetes Metab Res Rev* 25, 768-772.
- Im, J.A., Yu, B.P., Jeon, J.Y., and Kim, S.H. (2008). Relationship between osteocalcin and glucose metabolism in postmenopausal women. *Clin Chim Acta* 396, 66-69.
- In 't Anker, P.S., Scherjon, S.A., Kleijburg-van der Keur, C., Noort, W.A., Claas, F.H., Willemze, R., Fibbe, W.E., and Kanhai, H.H. (2003). Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 102, 1548-1549.
- Iotsova, V., Caamano, J., Loy, J., Yang, Y., Lewin, A., and Bravo, R. (1997). Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB1 and NF-kappaB2. *Nat Med* 3, 1285-1289.
- Ishida, Y., Killinger, D.W., Khalil, M.W., Yang, K., Strutt, B., and Heersche, J.N. (2002). Expression of steroid-converting enzymes in osteoblasts derived from rat vertebrae. *Osteoporos Int* 13, 235-240.
- Iso, Y., Spees, J.L., Serrano, C., Bakondi, B., Pochampally, R., Song, Y.H., Sobel, B.E., Delafontaine, P., and Prockop, D.J. (2007). Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 700-706.
- Issa, S., Schnabel, D., Feix, M., Wolf, L., Schaefer, H.E., Russell, D.W., and Schweikert, H.U. (2002). Human osteoblast-like cells express predominantly steroid 5alpha-reductase type 1. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 5401-5407.
- Jacobs, F.M., van der Heide, L.P., Wijchers, P.J., Burbach, J.P., Hoekman, M.F., and Smidt, M.P. (2003). FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *J Biol Chem* 278, 35959-35967.
- Jacques, E., Semlali, A., Boulet, L.P., and Chakir, J. AP-1 overexpression impairs corticosteroid inhibition of collagen production by fibroblasts isolated from asthmatic subjects. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 299, L281-287.
- Jagger, C.J., Lean, J.M., Davies, J.T., and Chambers, T.J. (2005). Tumor necrosis factor-alpha mediates osteopenia caused by depletion of antioxidants. *Endocrinology* 146, 113-118.
- Janssen-Heininger, Y.M., Mossman, B.T., Heintz, N.H., Forman, H.J., Kalyanaraman, B., Finkel, T., Stamler, J.S., Rhee, S.G., and van der Vliet, A. (2008). Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radic Biol Med* 45, 1-17.
- Janssen, J.M., Bland, R., Hewison, M., Coughtrie, M.W., Sharp, S., Arts, J., Pols, H.A., and van Leeuwen, J.P. (1999). Estradiol formation by human osteoblasts via multiple pathways: relation with osteoblast function. *J Cell Biochem* 75, 528-537.
- Jessop, H.L., Sjöberg, M., Cheng, M.Z., Zaman, G., Wheeler-Jones, C.P., and Lanyon, L.E. (2001). Mechanical strain and estrogen activate estrogen receptor alpha in bone cells. *J Bone Miner Res* 16, 1045-1055.

- Jilka, R.L., Almeida, M., Ambrogini, E., Han, L., Roberson, P.K., Weinstein, R.S., and Manolagas, S.C. Decreased oxidative stress and greater bone anabolism in the aged, when compared to the young, murine skeleton with parathyroid hormone administration. *Aging Cell* **9**, 851-867.
- Jin, H.K., Bae, J.S., Furuya, S., and Carter, J.E. (2009). Amyloid beta-derived neuroplasticity in bone marrow-derived mesenchymal stem cells is mediated by NPY and 5-HT<sub>2B</sub> receptors via ERK1/2 signalling pathways. *Cell Prolif* **42**, 571-586.
- Jones, E.A., English, A., Henshaw, K., Kinsey, S.E., Markham, A.F., Emery, P., and McGonagle, D. (2004). Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum* **50**, 817-827.
- Kajkenova, O., Lecka-Czernik, B., Gubrij, I., Hauser, S.P., Takahashi, K., Parfitt, A.M., Jilka, R.L., Manolagas, S.C., and Lipschitz, D.A. (1997). Increased adipogenesis and myelopoiesis in the bone marrow of SAMP6, a murine model of defective osteoblastogenesis and low turnover osteopenia. *J Bone Miner Res* **12**, 1772-1779.
- Kanazawa, I., Yamaguchi, T., Yamamoto, M., Yamauchi, M., Kurioka, S., Yano, S., and Sugimoto, T. (2009). Serum osteocalcin level is associated with glucose metabolism and atherosclerosis parameters in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 45-49.
- Kanda, Y., Hinata, T., Kang, S.W., and Watanabe, Y. Reactive oxygen species mediate adipocyte differentiation in mesenchymal stem cells. *Life Sci* **89**, 250-258.
- Karsenty, G., and Ferron, M. The contribution of bone to whole-organism physiology. *Nature* **481**, 314-320.
- Kato, Y., and Gospodarowicz, D. (1985). Stimulation by glucocorticoid of the synthesis of cartilage-matrix proteoglycans produced by rabbit costal chondrocytes in vitro. *J Biol Chem* **260**, 2364-2373.
- Kawai, M., Devlin, M.J., and Rosen, C.J. (2009). Fat targets for skeletal health. *Nat Rev Rheumatol* **5**, 365-372.
- Kennell, J.A., and MacDougald, O.A. (2005). Wnt signaling inhibits adipogenesis through beta-catenin-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* **280**, 24004-24010.
- Kerppola, T.K., Luk, D., and Curran, T. (1993). Fos is a preferential target of glucocorticoid receptor inhibition of AP-1 activity in vitro. *Mol Cell Biol* **13**, 3782-3791.
- Khan, E., and Abu-Amer, Y. (2003). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits differentiation of preosteoblasts. *J Lab Clin Med* **142**, 29-34.
- Kindblom, J.M., Ohlsson, C., Ljunggren, O., Karlsson, M.K., Tivesten, A., Smith, U., and Mellstrom, D. (2009). Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. *J Bone Miner Res* **24**, 785-791.
- Kinoshita, M., Ono, K., Horie, T., Nagao, K., Nishi, H., Kuwabara, Y., Takanabe-Mori, R., Hasegawa, K., Kita, T., and Kimura, T. Regulation of adipocyte differentiation by activation of

- serotonin (5-HT) receptors 5-HT<sub>2A</sub>R and 5-HT<sub>2C</sub>R and involvement of microRNA-448-mediated repression of KLF5. *Mol Endocrinol* **24**, 1978-1987.
- Koga, H., Muneta, T., Nagase, T., Nimura, A., Ju, Y.J., Mochizuki, T., and Sekiya, I. (2008). Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Res* **333**, 207-215.
  - Kopen, G.C., Prockop, D.J., and Phinney, D.G. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10711-10716.
  - Krings, A., Rahman, S., Huang, S., Lu, Y., Czernik, P.J., and Lecka-Czernik, B. Bone marrow fat has brown adipose tissue characteristics, which are attenuated with aging and diabetes. *Bone* **50**, 546-552.
  - Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5925-5930.
  - Kuroki, T., Nagao, N., and Nakahara, T. (2008). Neuropharmacology of second-generation antipsychotic drugs: a validity of the serotonin-dopamine hypothesis. *Prog Brain Res* **172**, 199-212.
  - Kushner, P.J., Agard, D., Feng, W.J., Lopez, G., Schiau, A., Uht, R., Webb, P., and Greene, G. (2000). Oestrogen receptor function at classical and alternative response elements. *Novartis Found Symp* **230**, 20-26; discussion 27-40.
  - Kushnir-Sukhov, N.M., Gilfillan, A.M., Coleman, J.W., Brown, J.M., Bruening, S., Toth, M., and Metcalfe, D.D. (2006). 5-hydroxytryptamine induces mast cell adhesion and migration. *J Immunol* **177**, 6422-6432.
  - Kuznetsov, S.A., Friedenstein, A.J., and Robey, P.G. (1997). Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *Br J Haematol* **97**, 561-570.
  - Labrie, F., Luu-The, V., Lin, S.X., Labrie, C., Simard, J., Breton, R., and Belanger, A. (1997). The key role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids* **62**, 148-158.
  - Lawrie, A., Spiekerkoetter, E., Martinez, E.C., Ambartsumian, N., Sheward, W.J., MacLean, M.R., Harmar, A.J., Schmidt, A.M., Lukanidin, E., and Rabinovitch, M. (2005). Interdependent serotonin transporter and receptor pathways regulate S100A4/Mts1, a gene associated with pulmonary vascular disease. *Circ Res* **97**, 227-235.
  - Lean, J.M., Davies, J.T., Fuller, K., Jagger, C.J., Kirstein, B., Partington, G.A., Urry, Z.L., and Chambers, T.J. (2003). A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss. *J Clin Invest* **112**, 915-923.
  - LeBlanc, A., Schneider, V., Shackelford, L., West, S., Oganov, V., Bakulin, A., and Voronin, L. (2000). Bone mineral and lean tissue loss after long duration space flight. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **1**, 157-160.

- Lecka-Czernik, B., Moerman, E.J., Grant, D.F., Lehmann, J.M., Manolagas, S.C., and Jilka, R.L. (2002). Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. *Endocrinology* **143**, 2376-2384.
- Lee, H., Lee, Y.J., Choi, H., Ko, E.H., and Kim, J.W. (2009). Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion. *J Biol Chem* **284**, 10601-10609.
- Lee, N.K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J.D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P.J., McKee, M.D., Jung, D.Y., *et al.* (2007). Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* **130**, 456-469.
- Lee, S.L., Wang, W.W., and Fanburg, B.L. (1998). Superoxide as an intermediate signal for serotonin-induced mitogenesis. *Free Radic Biol Med* **24**, 855-858.
- Lefterova, M.I., and Lazar, M.A. (2009). New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab* **20**, 107-114.
- Levinger, I., Zebaze, R., Jerums, G., Hare, D.L., Selig, S., and Seeman, E. The effect of acute exercise on undercarboxylated osteocalcin in obese men. *Osteoporos Int* **22**, 1621-1626.
- Li, Q.F., Spinelli, A.M., Wang, R., Anfinogenova, Y., Singer, H.A., and Tang, D.D. (2006). Critical role of vimentin phosphorylation at Ser-56 by p21-activated kinase in vimentin cytoskeleton signaling. *J Biol Chem* **281**, 34716-34724.
- Liang, B., Moussaif, M., Kuan, C.J., Gargus, J.J., and Sze, J.Y. (2006). Serotonin targets the DAF-16/FOXO signaling pathway to modulate stress responses. *Cell Metab* **4**, 429-440.
- Little, R.D., Carulli, J.P., Del Mastro, R.G., Dupuis, J., Osborne, M., Folz, C., Manning, S.P., Swain, P.M., Zhao, S.C., Eustace, B., *et al.* (2002). A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet* **70**, 11-19.
- Liu, B., Anderson, G., Mittmann, N., To, T., Axcell, T., and Shear, N. (1998). Use of selective serotonin-reuptake inhibitors or tricyclic antidepressants and risk of hip fractures in elderly people. *Lancet* **351**, 1303-1307.
- Liu, J.Q., Zelko, I.N., and Folz, R.J. (2004). Reoxygenation-induced constriction in murine coronary arteries: the role of endothelial NADPH oxidase (gp91phox) and intracellular superoxide. *J Biol Chem* **279**, 24493-24497.
- Locker, M., Bitard, J., Collet, C., Poliard, A., Mutel, V., Launay, J.M., and Kellermann, O. (2006). Stepwise control of osteogenic differentiation by 5-HT(2B) receptor signaling: nitric oxide production and phospholipase A2 activation. *Cell Signal* **18**, 628-639.
- Lu, H., Higashikata, T., Inazu, A., Nohara, A., Yu, W., Shimizu, M., and Mabuchi, H. (2002). Association of estrogen receptor-alpha gene polymorphisms with coronary artery disease in patients with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 817-823.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* **17**, 9-26.



- MacFarlane, P.M., Vinit, S., and Mitchell, G.S. Serotonin 2A and 2B receptor-induced phrenic motor facilitation: differential requirement for spinal NADPH oxidase activity. *Neuroscience* 178, 45-55.
- Mackay, A.M., Beck, S.C., Murphy, J.M., Barry, F.P., Chichester, C.O., and Pittenger, M.F. (1998). Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 4, 415-428.
- Manavathi, B., Acconcia, F., Rayala, S.K., and Kumar, R. (2006). An inherent role of microtubule network in the action of nuclear receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15981-15986.
- Manolagas, S.C. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocr Rev* 31, 266-300.
- Manolagas, S.C. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21, 115-137.
- Manolagas, S.C., Kousteni, S., Chen, J.R., Schuller, M., Plotkin, L., and Bellido, T. (2004). Kinase-mediated transcription, activators of nongenotropic estrogen-like signaling (ANGELS), and osteoporosis: a different perspective on the HRT dilemma. *Kidney Int Suppl*, S41-49.
- Manolagas, S.C., Kousteni, S., and Jilka, R.L. (2002). Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res* 57, 385-409.
- Masuda, H., Kalka, C., Takahashi, T., Yoshida, M., Wada, M., Kobori, M., Itoh, R., Iwaguro, H., Eguchi, M., Iwami, Y., *et al.* (2007). Estrogen-mediated endothelial progenitor cell biology and kinetics for physiological postnatal vasculogenesis. *Circ Res* 101, 598-606.
- Mates, J.M., and Sanchez-Jimenez, F. (1999). Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci* 4, D339-345.
- Maurer-Spurej, E., Pittendreigh, C., and Solomons, K. (2004). The influence of selective serotonin reuptake inhibitors on human platelet serotonin. *Thromb Haemost* 91, 119-128.
- McQueen, J.K., Wilson, H., and Fink, G. (1997). Estradiol-17 beta increases serotonin transporter (SERT) mRNA levels and the density of SERT-binding sites in female rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 45, 13-23.
- Meltzer, H.Y., Matsubara, S., and Lee, J.C. (1989). Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin2 pKi values. *J Pharmacol Exp Ther* 251, 238-246.
- Mendelsohn, M.E., and Karas, R.H. Rapid progress for non-nuclear estrogen receptor signaling. *J Clin Invest* 120, 2277-2279.
- Meunier, P., Aaron, J., Edouard, C., and Vignon, G. (1971). Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. A quantitative study of 84 iliac bone biopsies. *Clin Orthop Relat Res* 80, 147-154.



- Miao, Z., Jin, J., Chen, L., Zhu, J., Huang, W., Zhao, J., Qian, H., and Zhang, X. (2006). Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int* 30, 681-687.
- Mikhail, A.A., Beck, E.X., Shafer, A., Barut, B., Gbur, J.S., Zupancic, T.J., Schweitzer, A.C., Cioffi, J.A., Lacaud, G., Ouyang, B., *et al.* (1997). Leptin stimulates fetal and adult erythroid and myeloid development. *Blood* 89, 1507-1512.
- Minaire, P., Edouard, C., Arlot, M., and Meunier, P.J. (1984). Marrow changes in paraplegic patients. *Calcif Tissue Int* 36, 338-340.
- Mineau-Hanschke, R., Hechtman, H.B., and Shepro, D. (1989). Endothelial cell junctional integrity modulation by serotonin: an ultrastructural analysis. *Tissue Cell* 21, 161-170.
- Moiseiwitsch, J.R., and Lauder, J.M. (1995). Serotonin regulates mouse cranial neural crest migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7182-7186.
- Molinoff, P.B., and Axelrod, J. (1971). Biochemistry of catecholamines. *Annu Rev Biochem* 40, 465-500.
- Motyl, K.J., Dick-de-Paula, I., Maloney, A.E., Lotinun, S., Bornstein, S., de Paula, F.J., Baron, R., Houseknecht, K.L., and Rosen, C.J. Trabecular bone loss after administration of the second-generation antipsychotic risperidone is independent of weight gain. *Bone* 50, 490-498.
- Munoz-Elias, G., Marcus, A.J., Coyne, T.M., Woodbury, D., and Black, I.B. (2004). Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. *J Neurosci* 24, 4585-4595.
- Muruganandan, S., Roman, A.A., and Sinal, C.J. (2009). Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell Mol Life Sci* 66, 236-253.
- Nakahara, H., Dennis, J.E., Bruder, S.P., Haynesworth, S.E., Lennon, D.P., and Caplan, A.I. (1991). In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp Cell Res* 195, 492-503.
- Nauta, A.J., and Fibbe, W.E. (2007). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110, 3499-3506.
- Naveiras, O., Nardi, V., Wenzel, P.L., Hauschka, P.V., Fahey, F., and Daley, G.Q. (2009). Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* 460, 259-263.
- Nemecek, G.M., Coughlin, S.R., Handley, D.A., and Moskowitz, M.A. (1986). Stimulation of aortic smooth muscle cell mitogenesis by serotonin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 674-678.
- Nishimura, R., Hata, K., Ikeda, F., Ichida, F., Shimoyama, A., Matsubara, T., Wada, M., Amano, K., and Yoneda, T. (2008). Signal transduction and transcriptional regulation during mesenchymal cell differentiation. *J Bone Miner Metab* 26, 203-212.
- Nishio, E., and Watanabe, Y. (1997). The involvement of reactive oxygen species and arachidonic acid in alpha 1-adrenoceptor-induced smooth muscle cell proliferation and migration. *Br J Pharmacol* 121, 665-670.

- Noh, M. Interleukin-17A increases leptin production in human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Pharmacol* **83**, 661-670.
- Novo, E., Busletta, C., Bonzo, L.V., Povero, D., Paternostro, C., Mareschi, K., Ferrero, I., David, E., Bertolani, C., Caligiuri, A., *et al.* Intracellular reactive oxygen species are required for directional migration of resident and bone marrow-derived hepatic pro-fibrogenic cells. *J Hepatol* **54**, 964-974.
- O'Dowd, B.F., Nguyen, T., Marchese, A., Cheng, R., Lynch, K.R., Heng, H.H., Kolakowski, L.F., Jr., and George, S.R. (1998). Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics* **47**, 310-313.
- Ohashi, T., Kusuhashi, S., and Ishida, K. (1991). Immunoelectron microscopic demonstration of estrogen receptors in osteogenic cells of Japanese quail. *Histochemistry* **96**, 41-44.
- Ohlsson, C., Engdahl, C., Borjesson, A.E., Windahl, S.H., Studer, E., Westberg, L., Eriksson, E., Koskela, A., Tuukkanen, J., Krust, A., *et al.* Estrogen receptor-alpha expression in neuronal cells affects bone mass. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 983-988.
- Okazaki, R., Inoue, D., Shibata, M., Saika, M., Kido, S., Ooka, H., Tomiyama, H., Sakamoto, Y., and Matsumoto, T. (2002). Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. *Endocrinology* **143**, 2349-2356.
- Ookura, N., Fujimori, Y., Nishioka, K., Kai, S., Hara, H., and Ogawa, H. (2007). Adipocyte differentiation of human marrow mesenchymal stem cells reduces the supporting capacity for hematopoietic progenitors but not for severe combined immunodeficiency repopulating cells. *Int J Mol Med* **19**, 387-392.
- Oreffo, R.O., Kusec, V., Viridi, A.S., Flanagan, A.M., Grano, M., Zamboni-Zallone, A., and Triffitt, J.T. (1999). Expression of estrogen receptor-alpha in cells of the osteoclastic lineage. *Histochem Cell Biol* **111**, 125-133.
- Ortiz, L.A., Dutreil, M., Fattman, C., Pandey, A.C., Torres, G., Go, K., and Phinney, D.G. (2007). Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 11002-11007.
- Owman, C., Blay, P., Nilsson, C., and Lolait, S.J. (1996). Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **228**, 285-292.
- Pakala, R., Willerson, J.T., and Benedict, C.R. (1994). Mitogenic effect of serotonin on vascular endothelial cells. *Circulation* **90**, 1919-1926.
- Partridge, L., and Bruning, J.C. (2008). Forkhead transcription factors and ageing. *Oncogene* **27**, 2351-2363.
- Payne, M.W., Uhthoff, H.K., and Trudel, G. (2007). Anemia of immobility: caused by adipocyte accumulation in bone marrow. *Med Hypotheses* **69**, 778-786.

- Pecins-Thompson, M., Brown, N.A., Kohama, S.G., and Bethea, C.L. (1996). Ovarian steroid regulation of tryptophan hydroxylase mRNA expression in rhesus macaques. *J Neurosci* *16*, 7021-7029.
- Pedersen, S.B., Borglum, J.D., Eriksen, E.F., and Richelsen, B. (1991). Nuclear estradiol binding in rat adipocytes. Regional variations and regulatory influences of hormones. *Biochim Biophys Acta* *1093*, 80-86.
- Peister, A., Mellad, J.A., Larson, B.L., Hall, B.M., Gibson, L.F., and Prockop, D.J. (2004). Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* *103*, 1662-1668.
- Pereira, R.F., O'Hara, M.D., Laptev, A.V., Halford, K.W., Pollard, M.D., Class, R., Simon, D., Livezey, K., and Prockop, D.J. (1998). Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 1142-1147.
- Pfahl, M. (1993). Nuclear receptor/AP-1 interaction. *Endocr Rev* *14*, 651-658.
- Pierotti, S., Gandini, L., Lenzi, A., and Isidori, A.M. (2008). Pre-receptorial regulation of steroid hormones in bone cells: insights on glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* *108*, 292-299.
- Pietri, M., Schneider, B., Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Mutel, V., Launay, J.M., and Kellermann, O. (2005). Reactive oxygen species-dependent TNF-alpha converting enzyme activation through stimulation of 5-HT2B and alpha1D autoreceptors in neuronal cells. *FASEB J* *19*, 1078-1087.
- Pittas, A.G., Harris, S.S., Eliades, M., Stark, P., and Dawson-Hughes, B. (2009). Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* *94*, 827-832.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* *284*, 143-147.
- Pochampally, R.R., Neville, B.T., Schwarz, E.J., Li, M.M., and Prockop, D.J. (2004). Rat adult stem cells (marrow stromal cells) engraft and differentiate in chick embryos without evidence of cell fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 9282-9285.
- Prockop, D.J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* *276*, 71-74.
- Puig, O., and Mattila, J. Understanding Forkhead box class O function: lessons from *Drosophila melanogaster*. *Antioxid Redox Signal* *14*, 635-647.
- Rached, M.T., Kode, A., Silva, B.C., Jung, D.Y., Gray, S., Ong, H., Paik, J.H., DePinho, R.A., Kim, J.K., Karsenty, G., *et al.* FoxO1 expression in osteoblasts regulates glucose homeostasis through regulation of osteocalcin in mice. *J Clin Invest* *120*, 357-368.

- Rached, M.T., Kode, A., Xu, L., Yoshikawa, Y., Paik, J.H., Depinho, R.A., and Kousteni, S. FoxO1 is a positive regulator of bone formation by favoring protein synthesis and resistance to oxidative stress in osteoblasts. *Cell Metab* 11, 147-160.
- Rapport, M.M., Green, A.A., and Page, I.H. (1948). Serum vasoconstrictor, serotonin; chemical inactivation. *J Biol Chem* 176, 1237-1241.
- Revankar, C.M., Cimino, D.F., Sklar, L.A., Arterburn, J.B., and Prossnitz, E.R. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307, 1625-1630.
- Revankar, C.M., Mitchell, H.D., Field, A.S., Burai, R., Corona, C., Ramesh, C., Sklar, L.A., Arterburn, J.B., and Prossnitz, E.R. (2007). Synthetic estrogen derivatives demonstrate the functionality of intracellular GPR30. *ACS Chem Biol* 2, 536-544.
- Rhen, T., and Cidlowski, J.A. (2005). Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 353, 1711-1723.
- Richards, J.B., Papaioannou, A., Adachi, J.D., Joseph, L., Whitson, H.E., Prior, J.C., and Goltzman, D. (2007). Effect of selective serotonin reuptake inhibitors on the risk of fracture. *Arch Intern Med* 167, 188-194.
- Rodan, G.A., and Martin, T.J. (2000). Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 289, 1508-1514.
- Rodriguez, J.P., Astudillo, P., Rios, S., and Pino, A.M. (2008). Involvement of adipogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in osteoporosis. *Curr Stem Cell Res Ther* 3, 208-218.
- Rosen, C.J., and Bouxsein, M.L. (2006). Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2, 35-43.
- Sahin, E., and Depinho, R.A. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature* 464, 520-528.
- Sandberg, M., Vuorio, T., Hirvonen, H., Alitalo, K., and Vuorio, E. (1988). Enhanced expression of TGF-beta and c-fos mRNAs in the growth plates of developing human long bones. *Development* 102, 461-470.
- Sarugaser, R., Lickorish, D., Baksh, D., Hosseini, M.M., and Davies, J.E. (2005). Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* 23, 220-229.
- Sasaki, M., Abe, R., Fujita, Y., Ando, S., Inokuma, D., and Shimizu, H. (2008). Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol* 180, 2581-2587.
- Sauer, H., Rahimi, G., Hescheler, J., and Wartenberg, M. (2000). Role of reactive oxygen species and phosphatidylinositol 3-kinase in cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *FEBS Lett* 476, 218-223.

- Sawakami, K., Robling, A.G., Ai, M., Pitner, N.D., Liu, D., Warden, S.J., Li, J., Maye, P., Rowe, D.W., Duncan, R.L., *et al.* (2006). The Wnt co-receptor LRP5 is essential for skeletal mechanotransduction but not for the anabolic bone response to parathyroid hormone treatment. *J Biol Chem* *281*, 23698-23711.
- Schneider, B., Pietri, M., Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Mutel, V., Launay, J.M., and Kellermann, O. (2006). Control of bioamine metabolism by 5-HT<sub>2B</sub> and alpha 1D autoreceptors through reactive oxygen species and tumor necrosis factor-alpha signaling in neuronal cells. *Ann N Y Acad Sci* *1091*, 123-141.
- Schule, R., Rangarajan, P., Kliewer, S., Ransone, L.J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I.M., and Evans, R.M. (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* *62*, 1217-1226.
- Schweikert, H.U., Rulf, W., Niederle, N., Schafer, H.E., Keck, E., and Kruck, F. (1980). Testosterone metabolism in human bone. *Acta Endocrinol (Copenh)* *95*, 258-264.
- Schweikert, H.U., Wolf, L., and Romalo, G. (1995). Oestrogen formation from androstenedione in human bone. *Clin Endocrinol (Oxf)* *43*, 37-42.
- Sen, B., Xie, Z., Case, N., Ma, M., Rubin, C., and Rubin, J. (2008). Mechanical strain inhibits adipogenesis in mesenchymal stem cells by stimulating a durable beta-catenin signal. *Endocrinology* *149*, 6065-6075.
- Seuwen, K., Magnaldo, I., and Pouyssegur, J. (1988). Serotonin stimulates DNA synthesis in fibroblasts acting through 5-HT<sub>1B</sub> receptors coupled to a Gi-protein. *Nature* *335*, 254-256.
- Shalhoub, V., Conlon, D., Tassinari, M., Quinn, C., Partridge, N., Stein, G.S., and Lian, J.B. (1992). Glucocorticoids promote development of the osteoblast phenotype by selectively modulating expression of cell growth and differentiation associated genes. *J Cell Biochem* *50*, 425-440.
- Shemshedini, L., Knauthe, R., Sassone-Corsi, P., Pornon, A., and Gronemeyer, H. (1991). Cell-specific inhibitory and stimulatory effects of Fos and Jun on transcription activation by nuclear receptors. *EMBO J* *10*, 3839-3849.
- Shi, S., and Gronthos, S. (2003). Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* *18*, 696-704.
- Shockley, K.R., Lazarenko, O.P., Czernik, P.J., Rosen, C.J., Churchill, G.A., and Lecka-Czernik, B. (2009). PPARgamma2 nuclear receptor controls multiple regulatory pathways of osteoblast differentiation from marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* *106*, 232-246.
- Shockley, K.R., Rosen, C.J., Churchill, G.A., and Lecka-Czernik, B. (2007). PPARgamma2 Regulates a Molecular Signature of Marrow Mesenchymal Stem Cells. *PPAR Res* *2007*, 81219.
- Simpson, E., Rubin, G., Clyne, C., Robertson, K., O'Donnell, L., Jones, M., and Davis, S. (2000). The role of local estrogen biosynthesis in males and females. *Trends Endocrinol Metab* *11*, 184-188.

- Simpson, E.R., and Davis, S.R. (2001). Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis--some new perspectives. *Endocrinology* 142, 4589-4594.
- Sjoerdsma, A. (1959). Serotonin. *N Engl J Med* 261, 231-237 concl.
- Sjoerdsma, A., and Palfreyman, M.G. (1990). History of serotonin and serotonin disorders. *Ann N Y Acad Sci* 600, 1-7; discussion 7-8.
- Smith, L.J., Henderson, J.A., Abell, C.W., and Bethea, C.L. (2004). Effects of ovarian steroids and raloxifene on proteins that synthesize, transport, and degrade serotonin in the raphe region of macaques. *Neuropsychopharmacology* 29, 2035-2045.
- Smith, M., Burke, Z., and Carter, D. (1996). Tonic suppression of adrenal AP-1 activity by glucocorticoids. *Mol Cell Endocrinol* 122, 151-158.
- Snykers, S., De Kock, J., Rogiers, V., and Vanhaecke, T. (2009). In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. *Stem Cells* 27, 577-605.
- Stepniak, E., Radice, G.L., and Vasioukhin, V. (2009). Adhesive and signaling functions of cadherins and catenins in vertebrate development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a002949.
- Stunes, A.K., Reseland, J.E., Hauso, O., Kidd, M., Tommeras, K., Waldum, H.L., Syversen, U., and Gustafsson, B.I. Adipocytes express a functional system for serotonin synthesis, reuptake and receptor activation. *Diabetes Obes Metab* 13, 551-558.
- Stykarsdottir, U., Halldorsson, B.V., Gretarsdottir, S., Gudbjartsson, D.F., Walters, G.B., Ingvarsson, T., Jonsdottir, T., Saemundsdottir, J., Center, J.R., Nguyen, T.V., *et al.* (2008). Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures. *N Engl J Med* 358, 2355-2365.
- Sumner, B.E., Grant, K.E., Rosie, R., Hegele-Hartung, C., Fritzemeier, K.H., and Fink, G. (2007). Raloxifene blocks estradiol induction of the serotonin transporter and 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor in female rat brain. *Neurosci Lett* 417, 95-99.
- Sun, H., Wang, H., and Hu, S. Effects of estrogen on diverse stem cells and relevant intracellular mechanisms. *Sci China Life Sci* 53, 542-547.
- Sundaresan, M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Irani, K., and Finkel, T. (1995). Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 270, 296-299.
- Sung, J.H., Yang, H.M., Park, J.B., Choi, G.S., Joh, J.W., Kwon, C.H., Chun, J.M., Lee, S.K., and Kim, S.J. (2008). Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. *Transplant Proc* 40, 2649-2654.
- Takada, I., Kouzmenko, A.P., and Kato, S. (2009). Molecular switching of osteoblastogenesis versus adipogenesis: implications for targeted therapies. *Expert Opin Ther Targets* 13, 593-603.
- Takada, I., Suzawa, M., Matsumoto, K., and Kato, S. (2007). Suppression of PPAR transactivation switches cell fate of bone marrow stem cells from adipocytes into osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci* 1116, 182-195.

- Takada, Y., Kato, C., Kondo, S., Korenaga, R., and Ando, J. (1997). Cloning of cDNAs encoding G protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to fluid shear stress. *Biochem Biophys Res Commun* **240**, 737-741.
- Takeda, S., Elefteriou, F., Levasseur, R., Liu, X., Zhao, L., Parker, K.L., Armstrong, D., Ducy, P., and Karsenty, G. (2002). Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* **111**, 305-317.
- Tanaka, Y., Sasaki, M., Kaneuchi, M., Shiina, H., Igawa, M., and Dahiya, R. (2003). Polymorphisms of estrogen receptor alpha in prostate cancer. *Mol Carcinog* **37**, 202-208.
- Tang, D.D., Bai, Y., and Gunst, S.J. (2005). Silencing of p21-activated kinase attenuates vimentin phosphorylation on Ser-56 and reorientation of the vimentin network during stimulation of smooth muscle cells by 5-hydroxytryptamine. *Biochem J* **388**, 773-783.
- Tavassoli, M. (1984). Marrow adipose cells and hemopoiesis: an interpretative review. *Exp Hematol* **12**, 139-146.
- Tecott, L.H., Sun, L.M., Akana, S.F., Strack, A.M., Lowenstein, D.H., Dallman, M.F., and Julius, D. (1995). Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT<sub>2c</sub> serotonin receptors. *Nature* **374**, 542-546.
- Teitelbaum, S.L. (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science* **289**, 1504-1508.
- Teixeira, C.C., Liu, Y., Thant, L.M., Pang, J., Palmer, G., and Alikhani, M. Foxo1, a novel regulator of osteoblast differentiation and skeletogenesis. *J Biol Chem* **285**, 31055-31065.
- Terzic, N., Vujcic, M., Ristic-Fira, A., Krstic-Demonacos, M., Milanovic, D., Kanazir, D.T., and Ruzdijic, S. (2003). Effects of age and dexamethasone treatment on glucocorticoid response element and activating protein-1 binding activity in rat brain. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **58**, 297-303.
- Thannickal, V.J., and Fanburg, B.L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**, L1005-1028.
- Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J., and Dong, J. (2005). Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* **146**, 624-632.
- Tian, E., Zhan, F., Walker, R., Rasmussen, E., Ma, Y., Barlogie, B., and Shaughnessy, J.D., Jr. (2003). The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med* **349**, 2483-2494.
- Tintut, Y., Alfonso, Z., Saini, T., Radcliff, K., Watson, K., Bostrom, K., and Demer, L.L. (2003). Multilineage potential of cells from the artery wall. *Circulation* **108**, 2505-2510.
- Trouche, E., Mias, C., Seguelas, M.H., Ordener, C., Cussac, D., and Parini, A. Characterization of monoamine oxidases in mesenchymal stem cells: role in hydrogen peroxide generation and serotonin-dependent apoptosis. *Stem Cells Dev* **19**, 1571-1578.
- Tyner, S.D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebranious, N., Igelmann, H., Lu, X., Soron, G., Cooper, B., Brayton, C., *et al.* (2002). p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* **415**, 45-53.



- Uccelli, A., Mancardi, G., and Chiesa, S. (2008a). Is there a role for mesenchymal stem cells in autoimmune diseases? *Autoimmunity* **41**, 592-595.
- Uccelli, A., Moretta, L., and Pistoia, V. (2008b). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* **8**, 726-736.
- Uchida-Kitajima, S., Yamauchi, T., Takashina, Y., Okada-Iwabu, M., Iwabu, M., Ueki, K., and Kadowaki, T. (2008). 5-Hydroxytryptamine 2A receptor signaling cascade modulates adiponectin and plasminogen activator inhibitor 1 expression in adipose tissue. *FEBS Lett* **582**, 3037-3044.
- Verma, S., Rajaratnam, J.H., Denton, J., Hoyland, J.A., and Byers, R.J. (2002). Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis. *J Clin Pathol* **55**, 693-698.
- Vestergaard, P., Rejnmark, L., and Mosekilde, L. (2008). Selective serotonin reuptake inhibitors and other antidepressants and risk of fracture. *Calcif Tissue Int* **82**, 92-101.
- Vidal, O., Kindblom, L.G., and Ohlsson, C. (1999). Expression and localization of estrogen receptor-beta in murine and human bone. *J Bone Miner Res* **14**, 923-929.
- Walther, D.J., and Bader, M. (2003). A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol* **66**, 1673-1680.
- Walther, D.J., Peter, J.U., Bashammakh, S., Hortnagl, H., Voits, M., Fink, H., and Bader, M. (2003). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* **299**, 76.
- Wang, F.S., Ko, J.Y., Lin, C.L., Wu, H.L., Ke, H.J., and Tai, P.J. (2007). Knocking down dickkopf-1 alleviates estrogen deficiency induction of bone loss. A histomorphological study in ovariectomized rats. *Bone* **40**, 485-492.
- Wang, F.S., Ko, J.Y., Weng, L.H., Yeh, D.W., Ke, H.J., and Wu, S.L. (2009). Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta attenuates glucocorticoid-induced bone loss. *Life Sci* **85**, 685-692.
- Wang, F.S., Ko, J.Y., Yeh, D.W., Ke, H.C., and Wu, H.L. (2008). Modulation of Dickkopf-1 attenuates glucocorticoid induction of osteoblast apoptosis, adipocytic differentiation, and bone mass loss. *Endocrinology* **149**, 1793-1801.
- Wang, Q., Yu, J.H., Zhai, H.H., Zhao, Q.T., Chen, J.W., Shu, L., Li, D.Q., Liu, D.Y., Dong, C., and Ding, Y. (2006). Temporal expression of estrogen receptor alpha in rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **347**, 117-123.
- Wang, Y.D., Tao, M.F., Wang, L., Cheng, W.W., and Wan, X.P. Selective Regulation of Osteoblastic OPG and RANKL by Dehydroepiandrosterone Through Activation of the Estrogen Receptor beta-mediated MAPK Signaling Pathway. *Horm Metab Res* **44**, 494-500.
- Watters, J.J., Campbell, J.S., Cunningham, M.J., Krebs, E.G., and Dorsa, D.M. (1997). Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology* **138**, 4030-4033.



- Welles, S.L., Shepro, D., and Hechtman, H.B. (1985). Vasoactive amines modulate actin cables (stress fibers) and surface area in cultured bovine endothelium. *J Cell Physiol* 123, 337-342.
- Westbroek, I., van der Plas, A., de Rooij, K.E., Klein-Nulend, J., and Nijweide, P.J. (2001). Expression of serotonin receptors in bone. *J Biol Chem* 276, 28961-28968.
- White, U.A., and Stephens, J.M. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 318, 10-14.
- Wilson, A., and Trumpp, A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 6, 93-106.
- Winhofer, Y., Handisurya, A., Tura, A., Bittighofer, C., Klein, K., Schneider, B., Bieglmayer, C., Wagner, O.F., Pacini, G., Luger, A., *et al.* Osteocalcin is related to enhanced insulin secretion in gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 33, 139-143.
- Wislet-Gendebien, S., Hans, G., Leprince, P., Rigo, J.M., Moonen, G., and Rogister, B. (2005). Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells* 23, 392-402.
- Wronski, T.J., Walsh, C.C., and Ignaszewski, L.A. (1986). Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Bone* 7, 119-123.
- Wu, Y., Chen, L., Scott, P.G., and Tredget, E.E. (2007). Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells* 25, 2648-2659.
- Yadav, V.K., Oury, F., Suda, N., Liu, Z.W., Gao, X.B., Confavreux, C., Klemenhagen, K.C., Tanaka, K.F., Gingrich, J.A., Guo, X.E., *et al.* (2009). A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. *Cell* 138, 976-989.
- Yadav, V.K., Ryu, J.H., Suda, N., Tanaka, K.F., Gingrich, J.A., Schutz, G., Glorieux, F.H., Chiang, C.Y., Zajac, J.D., Insogna, K.L., *et al.* (2008). Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell* 135, 825-837.
- Yang-Yen, H.F., Chambard, J.C., Sun, Y.L., Smeal, T., Schmidt, T.J., Drouin, J., and Karin, M. (1990). Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62, 1205-1215.
- Yang, S., Xu, H., Yu, S., Cao, H., Fan, J., Ge, C., Franceschi, R.T., Dong, H.H., and Xiao, G. Foxo1 mediates insulin-like growth factor 1 (IGF1)/insulin regulation of osteocalcin expression by antagonizing Runx2 in osteoblasts. *J Biol Chem* 286, 19149-19158.
- Yang, X., and Karsenty, G. (2002). Transcription factors in bone: developmental and pathological aspects. *Trends Mol Med* 8, 340-345.
- Yeap, B.B., Chubb, S.A., Flicker, L., McCaul, K.A., Ebeling, P.R., Beilby, J.P., and Norman, P.E. Reduced serum total osteocalcin is associated with metabolic syndrome in older men via waist circumference, hyperglycemia, and triglyceride levels. *Eur J Endocrinol* 163, 265-272.
- Yokota, T., Meka, C.S., Kouro, T., Medina, K.L., Igarashi, H., Takahashi, M., Oritani, K., Funahashi, T., Tomiyama, Y., Matsuzawa, Y., *et al.* (2003). Adiponectin, a fat cell product,

influences the earliest lymphocyte precursors in bone marrow cultures by activation of the cyclooxygenase-prostaglandin pathway in stromal cells. *J Immunol* 171, 5091-5099.

- Yokota, T., Meka, C.S., Medina, K.L., Igarashi, H., Comp, P.C., Takahashi, M., Nishida, M., Oritani, K., Miyagawa, J., Funahashi, T., *et al.* (2002). Paracrine regulation of fat cell formation in bone marrow cultures via adiponectin and prostaglandins. *J Clin Invest* 109, 1303-1310.
- Yoo, K.H., Jang, I.K., Lee, M.W., Kim, H.E., Yang, M.S., Eom, Y., Lee, J.E., Kim, Y.J., Yang, S.K., Jung, H.L., *et al.* (2009). Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell Immunol* 259, 150-156.
- Yuen, E.Y., Jiang, Q., Chen, P., Gu, Z., Feng, J., and Yan, Z. (2005). Serotonin 5-HT1A receptors regulate NMDA receptor channels through a microtubule-dependent mechanism. *J Neurosci* 25, 5488-5501.
- Zhou, S., Zilberman, Y., Wassermann, K., Bain, S.D., Sadovsky, Y., and Gazit, D. (2001). Estrogen modulates estrogen receptor alpha and beta expression, osteogenic activity, and apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs) of osteoporotic mice. *J Cell Biochem Suppl* 36, 144-155.
- Ziere, G., Dieleman, J.P., van der Cammen, T.J., Hofman, A., Pols, H.A., and Stricker, B.H. (2008). Selective serotonin reuptake inhibiting antidepressants are associated with an increased risk of nonvertebral fractures. *J Clin Psychopharmacol* 28, 411-417.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.L., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., and Hedrick, M.H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13, 4279-4295.
- Zvaifler, N.J., Marinova-Mutafchieva, L., Adams, G., Edwards, C.J., Moss, J., Burger, J.A., and Maini, R.N. (2000). Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2, 477-488.